

MONOCLONAL ANTIBODY FOR COCCIDIUM**Publication number:** JP61069798**Publication date:** 1986-04-10**Inventor:** KARERU ZETSUTO NIYUUMAN JIYUNI; TOOMASU SHII GOA; JIYON ERU TEDESUKO; GEIRII AARU PIITAASEN; RANDEI AARU SHIMONSON; BAAJINIA MERII BURAZAAZU; JIEEMUSU GOODON FUAIIRUZU; RERANDO SHIYOON POORU**Applicant:** SOLVAY**Classification:**

- international: *G01N33/569; A61K39/012; A61K39/395; C07K1/22; C07K14/00; C07K14/005; C07K14/195; C07K14/435; C07K14/44; C07K14/455; C07K16/00; C07K16/20; C07K16/42; C12N15/00; C12N15/02; C12N15/09; C12P21/00; C12P21/02; C12P21/08; G01N33/577; A61K38/00; A61K39/00; G01N33/569; A61K39/002; A61K39/395; C07K1/00; C07K14/00; C07K14/005; C07K14/195; C07K14/435; C07K16/00; C07K16/18; C07K16/42; C12N15/00; C12N15/02; C12N15/09; C12P21/00; C12P21/02; C12P21/08; G01N33/577; A61K38/00; A61K39/00; (IPC1-7): A61K39/012; A61K39/395; C07K13/00; C07K15/04; C07K15/08; C12N15/00; C12P21/00; G01N33/569; G01N33/577*

- European: C07K14/455; C07K16/20; C07K16/42K14A

Application number: JP19850122355 19850605**Priority number(s):** US19850734085 19850516; US19840617483 19840605**Also published as:**

EP0164176 (A)

EP0164176 (A)

EP0164176 (B)

Report a data error he

Abstract not available for JP61069798

Abstract of corresponding document: **EP0164176**

A purified antigenic protein has been obtained which is capable of inducing in a chicken an immune response conferring protection against infection by *Eimeria tenella* or *Eimeria necatrix*. The protein has a molecular weight of about 25,000 and is composed of two polypeptides joined by a disulfide bond. The two polypeptide subunits have molecular weights of about 17,000 and about 8,000, respectively. The gene encoding the protein has been sequenced and the amino acid sequence of the protein deduced therefrom and by direct peptide sequencing. The protein and antigenic polypeptides having an amino acid sequence included within the protein may be incorporated into a vaccine for conferring upon a chicken active immunity against infection by *E. tenella* and *E. necatrix*. A hybridoma cell line (ATCC No. HB8561) has been developed which produces a monoclonal antibody designated Ptn 7.2A4/4. This antibody may be used to confer upon a chicken specific passive protection against infection by *E. tenella* and *E. necatrix*. The antibody may also be used to obtain the purified protein antigen and the 11,500 and 6,500 dalton polypeptide fragments thereof. Finally, an anti-idiotypic antibody to the Ptn.

FIG PAGE BLANK (USPTO)

7.2A4/4 monoclonal antibody may be prepared and used to confer upon a chicken active immunity against *E. tenella* and *E. necatrix* infection.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

01 01000700001 0 1007, 00, 0

2007/03/01

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-69798

⑮ Int. Cl.⁴
C 07 K 15/08
A 61 K 39/012
39/395

識別記号

庁内整理番号

6464-4H
7043-4C
7043-4C

⑬ 公開 昭和61年(1986)4月10日

※審査請求 未請求 発明の数 41 (全34頁)

⑭ 発明の名称 コクシジウムのモノクローナル抗体

⑯ 特 願 昭60-122355

⑰ 出 願 昭60(1985)6月5日

優先権主張 ⑱ 1984年6月5日 ⑲ 米国(US) ⑳ 617483

㉑ 発 明 者 カレル セット・ニュー アメリカ合衆国アイオワ州チャールズ シイテイ, ケリイ
ーマン, ジュニア ストリート 306

㉒ 発 明 者 トーマス シー・ゴア アメリカ合衆国アイオワ州チャールズ シイテイ, ヒルド
レス ストリート 1106

㉓ 出 願 人 ソルベイ アンド カ ベルギー国ブリュッセル, リュ ドウ プリンス アルベ
ンパニー (ソシエテ ール, 33
アノニム)

㉔ 代 理 人 弁理士 浅 村 皓 外2名
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

コクシジウムのモノクローナル抗体

2. 特許請求の範囲

- (1) 鶏においてエイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*) 又はエイメリア・ネカトリックス (*Eimeria necatrix*) による感染に対する防御能をあたえる免疫応答を誘導することのできる精製した抗原性蛋白において、分子量が約17,000であり、N-末端アミノ酸がプロックされている第(3)図に示すアミノ酸配列を有する1つのポリペプチドと、分子量が約8,000であり第(3)図に示すアミノ酸配列を有するもう1つのポリペプチドが、ジスルフィド結合により結合した、2つのポリペプチドより成る、分子量が約25,000の上記蛋白。
- (2) 特許請求の範囲第1項に記載の蛋白のアミノ酸配列に含まれるアミノ酸配列を有し、鶏においてエイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*) 又はエイメリア・ネカトリックス (*Eimeria necatrix*)

による感染に対する防御能をあたえる免疫応答を誘導することのできる抗原性ポリペプチド。

(3) 特許請求の範囲第1項に記載のポリペプチドのアミノ酸配列に含まれるアミノ酸配列を有し、分子量が約11,500である抗原性ポリペプチド。

(4) 特許請求の範囲第1項に記載のポリペプチドのアミノ酸配列に含まれるアミノ酸配列を有し、分子量が約6,500である抗原性ポリペプチド。

(5) 鶏においてエイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*) 又はエイメリア・ネカトリックス (*Eimeria necatrix*) による感染に対する防御能を与える免疫応答を誘導することのできる、特許請求の範囲第2項に記載の抗原性ポリペプチドより成る抗原。

(6) 第3図に示すアミノ酸配列に含まれないアミノ酸配列をもさらに有する特許請求の範囲第5項に記載の抗原。

(7) 特許請求の範囲第1項に記載の蛋白の調製方法において、

a. スポロキスト膜蛋白を可溶化するためにプロ

テアーゼ阻害剤の存在下で適当な非還元条件下で、エイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*) のスポロキストを界面活性剤と接触させ、

b. 可溶化したスポロキスト膜蛋白を適当な非還元条件下で別々に回収する、
ことより成る上記方法。

(8) 別々に回収することとは、可溶化されたスポロキスト膜蛋白をイオン交換及びハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーにより部分的に精製することである特許請求の範囲第7項に記載の方法。

(9) 別々に回収することとは、モノクローナル抗体 Pto 7.2 A4/4 を用いる免疫沈降法又は免疫親和性クロマトグラフィーより成る特許請求の範囲第7項に記載の方法。

00 特許請求の範囲第1項に記載の17,000ダルトンのポリペプチドの調製方法において、
a. スポロキスト膜蛋白を可溶化するためにプロテアーゼ阻害剤の存在下で適当な条件下で、エイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*) のスポロキ

ストを界面活性剤と接触させ、

b. 可溶化したスポロキスト膜蛋白から適当な還元条件下でポリペプチドを別々に回収する、
ことより成る上記方法。

01 別々に回収することとは、DEAEセルロースによるクロマトグラフィーの後適当な還元条件下で調製 SDS 電気泳動により、可溶化したスポロキスト膜蛋白を部分的に精製することより成る特許請求の範囲第10項に記載の方法。

02 特許請求の範囲第3項に記載のポリペプチドの調製方法において、

a. スポロキストより種虫膜蛋白を抽出するために、8-ヒドロキシキノリンの存在下でエイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*) のスポロキストをフェノールに接触させ、

b. モノクローナル抗体 Pto 7.2 A4/4 を用いて免疫沈降法又は免疫親和性クロマトグラフィーにより抽出したスポロキスト膜蛋白からポリペプチドを回収する、
ことより成る上記方法。

03 特許請求の範囲第4項に記載のポリペプチドの調製方法において、

a. 蛋白を可溶化するためにトリプシン-タウロコレートで脱糞させた種虫膜蛋白を界面活性剤に接触させ、

b. モノクローナル抗体 Pto 7.2 A4/4 を用いて免疫沈降法又は免疫親和性クロマトグラフィーにより可溶化した脱糞させた種虫膜蛋白よりポリペプチドを回収する、
ことより成る上記方法。

04 特許請求の範囲第1項に記載の蛋白の調製方法において、該蛋白を暗号化するDNA分子を調製し、DNA分子を適当な発現ベクターに挿入し、こうして得られる発現ベクターを適当な条件化で適当な宿主に導入してDNAを発現させ及び蛋白を産生させ、こうして得られた蛋白を回収することより成る上記方法。

05 特許請求の範囲第2項に記載のポリペプチドの調製方法において、ポリペプチドを暗号化するDNA分子を調製し、DNA分子を適当な発現ベ

クターに挿入し、こうして得られる発現ベクターを適当な条件化で適当な宿主に導入してDNAを発現させ及びポリペプチドを産生させ、こうして得られたポリペプチドを回収することより成る上記方法。

06 特許請求の範囲第1項に記載の17,000ダルトンのポリペプチドの調製方法において、ポリペプチドを暗号化するDNA分子を調製し、DNA分子を適当な発現ベクターに挿入し、こうして得られる発現ベクターを適当な条件化で適当な宿主に導入してDNAを発現させ及びポリペプチドを産生させ、こうして得られたポリペプチドを回収することより成る上記方法。

07 特許請求の範囲第1項に記載の蛋白の有効な免疫量を鶏に投与することより成る、エイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*) による感染に対し鶏に能動免疫を与える方法。

08 特許請求の範囲第1項に記載の蛋白の有効な免疫量を鶏に投与することより成る、エイメリア・ネカトリックス (*Eimeria necatrix*) による感

染に対し鶏に能動免疫を与える方法。

04 特許請求の範囲第2項に記載のポリペプチドの有効な免疫量を鶏に投与することより成る、エイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*) 又はエイメリア・ネカトリックス (*Eimeria necatrix*) による感染に対し鶏に能動免疫を与える方法。

05 特許請求の範囲第5項に記載のポリペプチドの有効な免疫量を鶏に投与することより成る、エイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*) 又はエイメリア・ネカトリックス (*Eimeria necatrix*) による感染に対し鶏に能動免疫を与える方法。

06 有効な免疫量とは約0.1 μ g から約1.0 μ g である、特許請求の範囲第17項に記載の方法。

07 有効な免疫量とは約0.1 μ g から約1.0 μ g である、特許請求の範囲第18項に記載の方法。

08 エイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*) による感染に対し鶏に能動免疫を与えるためのワクチンにおいて、1回の投与量当たり有効な免疫量の特許請求の範囲第1項に記載の蛋白と適当な担体を含有する上記ワクチン。

09 有効な免疫量とは鶏の体重1 μ g 当たり約0.1 μ g を超える量である特許請求の範囲第24項に記載のワクチン。

10 特許請求の範囲第23項に記載のワクチンの適当な量を鶏に投与することより成る、エイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*) による感染から鶏を防御する方法。

11 特許請求の範囲第24項に記載のワクチンの適当な量を鶏に投与することより成る、エイメリア・ネカトリックス (*Eimeria necatrix*) による感染から鶏を防御する方法。

12 特許請求の範囲第1項に記載の蛋白に対するモノクローナル抗体。

13 特許請求の範囲第2項に記載のポリペプチドに対するモノクローナル抗体。

14 ハイブリドーマ細胞株 ATCC κ HB8561 により産生されるモノクローナル抗体 Ptn 7.2 A4/4。

15 特許請求の範囲第31項、32項、又は33項に記載の抗体の有効な防御量を鶏に投与することより成る、エイメリア・テネラ (*Eimeria*

tenella) 又はエイメリア・ネカトリックス (*Eimeria necatrix*) による感染に対し鶏に能動免疫を与えるためのワクチンにおいて、1回の投与量当たり有効な免疫量の特許請求の範囲第1項に記載の蛋白と適当な担体を含有する上記ワクチン。

16 エイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*) 又はエイメリア・ネカトリックス (*Eimeria necatrix*) による感染に対し鶏に能動免疫を与えるためのワクチンにおいて、1回の投与量当たり有効な免疫量の特許請求の範囲第2項に記載のポリペプチドと適当な担体を含有する上記ワクチン。

17 エイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*) 又はエイメリア・ネカトリックス (*Eimeria necatrix*) による感染に対し鶏に能動免疫を与えるためのワクチンにおいて、1回の投与量当たり有効な免疫量の特許請求の範囲第5項に記載のポリペプチドと適当な担体を含有する上記ワクチン。

18 有効な免疫量とは鶏の体重1 μ g 当たり約0.1 μ g を超える量である特許請求の範囲第23項に記載のワクチン。

tenella) 又はエイメリア・ネカトリックス (*Eimeria necatrix*) による感染に対し鶏に受動免疫を与える方法。

19 エイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*) 又はエイメリア・ネカトリックス (*Eimeria necatrix*) による感染に対し鶏に受動免疫を与えるための組成物において、有効な防御量の特許請求の範囲第31項、32、又は33項に記載の抗体及び適当な担体より成る上記組成物。

20 特許請求の範囲第35項に記載の組成物の適当な量を鶏に投与することより成る、エイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*) 又はエイメリア・ネカトリックス (*Eimeria necatrix*) による感染に対し鶏に受動免疫を与える方法。

21 特許請求の範囲第33項に記載のモノクローナル抗体に対する抗イデオタイプ抗体。

22 特許請求の範囲第37項に記載の抗イデオタイプ抗体の産生方法において、

a. ハイブリドーマ細胞株 ATCC κ HB8561 からモノクローナル抗体 Ptn 7.2 A4/4 を回収

し、

- b. このモノクローナル抗体を精製し、
 - c. 精製したモノクローナル抗体を適当なアジュバントと共に適当な動物に注射し、
 - d. 注射された動物から血清を回収し、
 - e. 血清から抗イデオタイプ抗体を回収する、
- ことより成る上記方法。

(4) 特許請求の範囲第37項に記載の抗イデオタイプ抗体の有効な免疫量を鶏に投与することより成る、エイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*) 又はエイメリア・ネカトリックス (*Eimeria necatrix*) による感染に対し鶏に能動免疫を与える方法。

(40) 特許請求の範囲第37項に記載の抗イデオタイプ抗体及び適当な担体の有効な免疫量を含む、エイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*) 又はエイメリア・ネカトリックス (*Eimeria necatrix*) による感染に対し鶏に能動免疫を与えるためのワクチン。

(41) 特許請求の範囲第40項に記載のワクチンの

の宿主細胞を適当な条件化で増殖させて蛋白を産生させ、産生した蛋白を回収することより成る、上記方法。

(50) 基本的に同じ配列を有するが、細菌宿主における発現において異なる特許請求の範囲第1項に記載の蛋白。

(51) 特許請求の範囲第43項に記載のDNAを得る方法において、エイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*) の接合子膜より全ゲノムDNAを単離し、こうして単離したゲノムDNAからDNA断片を調製し、こうして調製した断片を適当なクローニングベクターに結合させ、こうして調製したクローンのDNAを、第3図に示す核酸配列内の核酸配列を含有する(又は、に相補的な)オリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせて適当なクローンを同定し、この適当なクローンから、蛋白を暗号化し第3図に示す核酸配列を有するDNAを単離することより成る上記方法。

5. 発明の詳細な説明

発明分野の背景

適当量を鶏に投与することより成る、エイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*) 又はエイメリア・ネカトリックス (*Eimeria necatrix*) による感染にたいし鶏に防御能を与える方法。

(42) 特許請求の範囲第1項に記載の蛋白を暗号化する核酸分子。

(43) 第3図に示す核酸配列を有する特許請求の範囲第42項に記載のDNA分子。

(44) 特許請求の範囲第42項に記載のcDNA分子。

(45) 特許請求の範囲第2、第3、第4、第5、又は第6項のいずれか1項に記載のポリペプチドを暗号化するDNA分子。

(46) 特許請求の範囲第42項に記載の核酸より成るクローニング媒体 (vehicle)。

(47) 特許請求の範囲第46項に記載のクローニング媒体 (vehicle) より成る宿主細胞。

(48) 特許請求の範囲第47項に記載の細菌宿主。

(49) 第3図に示すアミノ酸配列を有する蛋白の産生方法において、特許請求の範囲第47項に記載

本特許出願は米国特許出願第617,483号(1984年6月5日申請)の継続出願である。前記特許の詳細は本出願に関連して本明細書に示してある。

本明細書では個々の引用文献を括弧内のアラビア数字でしめしてあり、これらの文献の詳細は本明細書の最後に示してある。本発明の申請時点における技術水準を詳しく示すために、これらの文献の内容を本明細書に示してある。

アピコンプレキサ (Apicomplexa) 門は、ユーコクシディオリダ (Eucoccidiorida) 目に属する数100種の異なる微生物を含む。エイメリア (*Eimeria*) 属は球中目に含まれる。エイメリア属に含まれる幾つかの種は養殖漁業に対し重要である。これらの種にはエイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*)、イー・マキシマ (*E. maxima*)、イー・アセルブリナ (*E. acervulina*)、イー・ネカトリックス (*E. necatrix*)、イー・ブルネッティ (*E. brunetti*)、イー・ミバーティ (*E. mivati*)、イー・ミティス (*E. mitis*)、イー・

プリーコックス (*E. praecox*) などがある。

これらの種の分類は宿主内の感染部位及び接合子囊の形態に基く。今日まで上記の各種において異なる生化学的マーカーが認められているが、これらは種の分類には用いられていない。

エイメリア (*Eimeria*) の全生活史は単一の宿主内で完了する。生活史の実際の段階はエイメリア (*Eimeria*) の種により異なる。イー・テネラ (*E. tenella*) は複雑な生活史を有している。汚染された糞便、食物、又は水と共に摂取されると、胞子形成した接合子囊はスポロカystsの機械的な破砕や酵素的加水分解により消化管内で脱囊する。放出された種虫は盲腸内の特異的な部位の上皮を通過し、リーベルキューン陰窩内で増殖して第1世代メロント (*Meront*) にまでなる。メロント (*Meront*) とは1つの遷移期であり、形態は丸くなり核が一層顕著になり、エネルギー産生及び蛋白合成能が増加している。メロント (*Meront*) が何回も分裂して第1世代メロゾイトとなる。第1世代メロゾイトが放出されて宿主

細胞が破壊され、この寄生虫は新しい宿主の所に移動して、2回目の無性生活史に入る。メロント (*Meront*) は放出されるのに伴って別の上皮細胞を破壊しながら、第2世代メロゾイトまで増殖する。第3世代のメロゾイトが放出されて宿主細胞がさらに破壊されていく。第2、及び第3世代のメロゾイトがさらに別の腸内細胞に感染して有性世代がはじまる。有性世代は配偶子形成により小配偶子及び大配偶子を形成することにより始まる。放出された小配偶子は配偶子に受精し接合子をつくる。未成熟接合子囊ができると宿主細胞が破裂する。腸管のルーメンに放出された接合子囊は、糞便を通して環境に出て大気中の酸素の存在下で成熟 (胞子形成) する。

宿主がそれ以上接合子囊を摂取しない場合は寄生虫の増殖は自己制限的である。しかしこれは混雑している養鶏場では実際にはおこりにくい。イー・テネラ (*E. tenella*) による疾病は大きな損失を招く。

イー・テネラ (*E. tenella*) 及びその他の種

によるコクシジウム症の病状は、大部分メロゾイトの放出時の宿主細胞の破裂に関係している。この場合腸管固有層内の組織が主に破壊される。理論的には、単一の接合子囊の摂取により120時間以内に 2.5×10^6 までの宿主細胞が破壊される (45)。消化管内の出血は、上皮に於ける毛細血管の破裂に関係している。コクシジウム症は一旦かかると抗コクシジウム剤を用いても病気の進行を押さえることは難しい。又二次感染がエイメリア (*Eimeria*) による疾病を複雑にすることがしばしばある。感染した鳥は普通4-7日以内に死ぬ。

コクシジウムは組織の非常に特異的な部位で感染を開始させるという性質があり (28, 33, 41)、この感染部位の特異性は普通エイメリア (*Eimeria*) の種の分類に用いられる特徴である。イー・テネラ (*E. tenella*) は盲腸の後部の上皮細胞に侵入しやすいという性質がある。このような感染の特異性は部分的には宿主細胞型の寄生虫抗原決定基、即ち特異的表面成分との相互作用

に依存している (9, 11, 40)。この説は又遺伝的に「耐性のある」鳥の研究からも支持されている。これらの鳥の細胞は通常の侵入部位内ではエイメリア (*Eimeria*) に侵入されない。他のコクシジウムの研究は、必須の宿主抗原決定基の発現は宿主細胞の有糸分裂状態の時期以外に細胞の由来組織に支配されることを明確に証明している (11)。

コクシジウム症の免疫に関する研究の多くは液性免疫、さらに詳しくは血清抗体に限られていた。これらの研究は血清抗体とコクシジウム症との間に相関がないことを示している (43)。しかし入手できるデータの多くはこの防御性応答には分泌性免疫系又は細胞性免疫 (CMI) 又はその両者を含む局所応答が関与していることを示している。

宿主細胞に対する病原菌の認識及び/又は付着に対する防衛は、ウイルス、細菌、及び原生動物で証明されたように防御効果がある。主要な宿主細胞リセプター又は病原菌付着部位の遺伝的欠損

は、最初の侵入過程を防止することができる(14, 40)。又は分泌性抗体は必須の宿主細胞抗原決定基に結合、従つてマスクすることにより、侵入を防害する(22, 54)。これまでに試験された全てのクラスの免疫グロブリンは、エイメリアテネラ(*Eimeria tenella*)の最初の侵入を防害する能力があると報告されている(10)。しかし最近の報告は分泌性IgAの産生のみが自然の防御性免疫と相関していることを示している(9, 43)。ポーター(Porter)とデービス(Davis)(10)及び他の研究者達(43)は、分泌性IgAは寄生虫の通過を有意に制限して寄生虫の細胞外段階の進行を中和するか、又は通過した寄生虫を減弱させて以後の増殖を防止することを報告している。

鶏におけるコクシジウム症の破壊的な影響を防ぐために、鶏生産者達は世界中で毎年5-10億ドルにも達するお金を使っていると推定されている(28, 39)。現在使用されている防止方法でも鶏の損失は大きく、数100万ドルであると

する多価組成物であり、飲料水中に投与して鶏に軽い寄生虫血症をひきおこす。この製品の欠点は投与後一週間以内に時々鶏に活動低下を起こすことである。過剰の投与又は数きわらの過剰の水分などもコクシジウム症の大流行をひき起こしてきた。例えば米国特許明細書第3,147,186号(1964年)では、イー・テネラ(*E. tenella*)の生きた孢子形成した接合子嚢を用いて鶏を免疫している。又米国特許明細書第4,301,148号(1981年)では、同様の目的のためにイー・テネラ(*E. tenella*)の嚢虫を用いている。

養鶏場で生きたワクチンを導入する又別の方法は飼料による。これは最近の英国特許(第2,008,404A号)で考察されている。イー・テネラ(*E. tenella*)の十分な病原性を有する接合子嚢を、飼料と混合する前に乾燥を防ぐために水溶性多糖でカプセル化している。この接合子嚢は無症状性感染を誘導することによりのみ十分である。この方法は免疫能は使れていることがわかったが、現場での許容性に問題があるため開発

推定されている(45)。

現在最も広く使用されている鶏のエイメリア(*Eimeria*)の防止方法は、抗原生動物剤食品添加物である。その具体的な組成は用いる抗コクシジウム剤により変わり、個々の物質はコクシジウムの生活史のある段階に作用するのみである(28, 38, 42)。抗コクシジウム剤を用いる欠点は、鶏における防御有効期間が短いこと、時々作用が減弱すること、寄生虫において薬剤に対する耐性が誘発されることなどたくさんある。薬剤耐性株が出現するために、現在市場に出ている製品の寿命はほんの数年である。これは有効な製品の開発及び連続的生産に対して大きな負担となる(38)。

免疫を利用して鶏を守ることは幾らかの成功をおさめている。死んだ微生物を用いて限定的防御を与えることもうまくいっている(1, 30, 31)。鶏の免疫のためのさらに良い方法は生きた原生動物(たとえばCuccivac)を用いる方法である(13)。この製品は生きた接合子嚢を少量含有

される見込みは少ない。しかし重要なコクシジウムの全ての株で減弱されたものが開発されるならば、この方法はもつと許容されるようになるであろう。

実験病原性の低下したエイメリア(*Eimeria*)系を開発する努力がなされている。鶏の胚を用いる移植によりうまく減弱された種が幾つかある(15, 26, 29, 48)。これらの株は疾病をひきおこす能力は低下しているが、免疫を誘発するには十分な免疫原性を有している。しかしこれらの株の取り扱いには幾つかの問題がある。例えば、イー・ネカトリックス(*E. necatrix*)の変種は移植の臨界点があり、何回も胚の移植を行なうと免疫原性の消失又は本来の病原型の維持につながる。さらに鶏を用いる最小逆移植により、減弱した微生物が病原型に戻るものもある(27, 50)。従つて減弱した微生物で一定の性質を維持するという問題がそんざいする。

エイメリア(*Eimeria*)子嚢の卵が直ちに移植できない時には早期選別による減弱も実施されて

いる。この方法では脱糞した感染子嚢を本格的な脱糞の開始前の感染初期無症候感染期の後期に脱糞した感染子嚢をみつめる(18, 35, 37, 49)。このような選別をすると生活史が短くなり、従つて病原性が減弱する(18, 35, 37, 49)。イー・テネラ(*E. tenella*)(19)及びイー・アセルブリナ(*E. acervulina*)(36)の早熟性は遺伝的に安定であることが証明されているが、養鶏産業においてこの方法の有用性を評価するのに十分な情報はない。鳥類コクシジウムの表面抗原の組成についてはほとんどわかっていない。エイメリア・テネラ(*Eimeria tenella*)の宿主の表面の抗原に対するモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ細胞株の報告がある(58)。この抗原は分子量が13から150キロダルトンの間であること以外は同定されなかつた。さらに生物学的意義やワクチンの効力も抗原と関係づけられなかつた。エム・エイチ・ウィッシャー(M.H. Wisner)の研究室での以前の仕事は、イー・テネラ(*E. tenella*)の脱糞した宿主の表面ヨ-

で彼らは鳥のエイメリア(*Eimeria*)種の抗原に対するモノクローナル抗体を産生できる可能性を示している(6, 7, 8)。同様にスピー(Speer)ら(51, 52)は、イー・テネラ(*E. tenella*)に対するモノクローナル抗体を開発しその生理学的性質を証明した。抗体分泌性ハイブリドーマは間接蛍光抗体法により選択された(7)。意外な観察として観察された反応のパターンは、使用したモノクローナル抗体により異なっていた。パターンには宿主との反応対宿主及びメロゾイトとの反応；宿主の前部の染色対全ての膜の染色；明瞭な内部小器官対はつきりしない染色などがあつた(8)。

モノクローナル抗体を産生するネズミ由来のハイブリドーマの調製法は公知であるが、宿主中和性ハイブリドーマの直接的及び特異的選択により、サブユニットワクチンの開発に有用なイー・テネラ(*E. tenella*)の病原性抗原決定基が同定できるかどうかはわからない。

実験サブユニットワクチンの開発に有用なエイメリア(*Eimeria*)の抗原の同定に関しては情報

不足により同定される約16個の分子量が20,000から200,000以上のポリペプチドが存在することを示唆している(57)。

ワクチン開発に対しサブユニットによる方法がうまくいくことが過去数年間証明された。この方法では最終的に大規模に生産することを目的として防御抗原と思われるものが同定され特徴づけられた。ある研究グループは寄生虫研究においてバベシア・ボビス(*Babesia bovis*)の表面の防御性抗原と思われるものを同定するためにモノクローナル抗体を使用した(59)。44,000ダルトンのこのビー・ボビス(*B. bovis*)抗原は同定され、精製して実験動物に注射した時、最初の抗原投与に対してある程度の防御能をしめした。トキソプラズマ・ゴンディ(*Toxoplasma gondii*)の免疫学的に重要な30,000ダルトンの蛋白も又モノクローナル抗体を使用して同定された(21)。

1981年の半ば以来、ダンフォース(Danforth)と共同研究者達は幾つかの文献を発表し、その中

がない。同様に、イー・テネラ(*E. tenella*)に対する受動免疫を与えるためにモノクローナル抗体を含有する製剤及び製剤の使用に関しても情報がない。

本発明はエイメリア・テネラ(*Eimeria tenella*)又はエイメリア・ネカトリックス(*Eimeria necatrix*)によるコクシジウム症に対する免疫能の開発のためのポリペプチド抗原の同定、特徴化、調製及び使用に関する。本抗原は直接的な抗原量で正確に投与され、そして疾病をひきおこさず、ワクチン接種連の病気の発生又は免疫学的性質の復帰や変化を避けることができる。

本発明は又抗原の精製、及び特にイー・テネラ(*E. tenella*)及びイー・ネカトリックス(*E. necatrix*)によるコクシジウム症に対する受動防御能を与えるために用いられると共に、抗原の精製に使用できる前記の防御性蛋白抗原に対するモノクローナル抗体生成物の調製、製剤化、及び使用に関する。

発明の要約

鶏においてエイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*) 又はエイメリア・ネカトリックス (*Eimeria necatrix*) による感染に対する防御能を与える免疫応答を誘導することのできる精製した抗原性蛋白(ここでは又A4蛋白又はA4抗原と称する)が得られた。この蛋白の分子量は約25,000であり、ジスルフィド結合により結合した2つのポリペプチドよりなる。このポリペプチドの1つは分子量が約17,000であり、N-末端アミノ酸はプロックされている。もう1つのポリペプチドは分子量が約8,000である。この2つのポリペプチドのアミノ酸配列は第3図に示してある。

イー・テネラ (*E. tenella*) 及びイー・ネカトリックス (*E. necatrix*) による感染に対して鶏に防御能を与える免疫応答を誘導することのできる、A4蛋白に関連するポリペプチドが得られる。このようなポリペプチドの2つが調製され、還元条件下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により決定したこれらのポリペプチドの分

適当な担体と共にワクチンに収められ、ワクチンの適量を鶏に投与する。

モノクローナル抗体 Pta 7.2 A4/4 又はこのような他の抗体は好ましくは適当な担体と共に、イー・テネラ (*E. tenella*) 及びイー・ネカトリックス (*E. necatrix*) による感染に対して受動免疫を与えるために用いられる。さらにこのモノクローナル抗体に対する抗イデオタイプ抗体を産生させ、これをイー・テネラ (*E. tenella*) 及びイー・ネカトリックス (*E. necatrix*) による感染に対して能動免疫を与えるために用いられる。好ましくは抗イデオタイプ抗体はワクチンの形で適当な担体と共に投与される。

図の簡単な説明

第1図は微量配列決定法 (Microsequencing) で決定したイー・テネラ (*E. tenella*) A4抗原の17,000ダルトンのポリペプチド成分のアミノ酸配列を示す。第1図は又種々の化学的及び酵素的分解により生じた重複するペプチドを示す。

子数は、それぞれ約11,500と6,500である。

分子量が25,000の生成した蛋白抗原は、エイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*) のスポロキャストから別々に回収することにより調製される。1つの好適な懸液では、ハイブリドーマ細胞株 ATCC 46 H B 8 5 6 1 により産生される高度に特異的なモノクローナル抗体 Pta 7.2 A4/4 を用いる免疫吸着クロマトグラフィー又は免疫沈降法により回収する。又はこの蛋白は蛋白を暗号化するDNA分子を用いる組み換えDNA技術により調製される。このようなDNA分子のスクレオチド配列を第3図に示す。11,500および6,500ダルトンのポリペプチドも同様に調製できる。

25,000ダルトンの蛋白抗原又は本発明の抗原性ポリペプチド(例えば11,500および6,500ダルトンのポリペプチド)の有効な免疫量を鶏に投与することにより、イー・テネラ (*E. tenella*) 及びイー・ネカトリックス (*E. necatrix*) による感染に対して鶏に能動免疫を与えることができる。好ましくはこの蛋白又はポリペプチドは

第2図はA4抗原を暗号化するイー・テネラ (*E. tenella*) のゲノムのクローンの制限酵素地図を示す。第2図は又5500塩基対のイー・テネラ (*E. tenella*) のEco RI DNA断片の位置と配列を示す。

第3図は、第2図に示すゲノムのクローンのBGI II-Eco RI DNA断片のDNAスクレオチド配列を示す。第3図はA4抗原の又シグナルペプチド及びのアミノ酸配列と17,000ダルトン及び8,000ダルトンポリペプチド成分のアミノ酸配列を示し、又遺伝子内のイントロンも示す。

発明の簡単な説明

本発明は、鶏においてエイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*) 又はエイメリア・ネカトリックス (*Eimeria necatrix*) による感染に対する防御能を与える免疫応答を誘導することのできる精製した抗原性蛋白に関する。この蛋白の分子量は約25,000であり、ジスルフィド結合により結合した2つのポリペプチドより成る。このポリペプチドの1つの分子量は約17,000であり、

N-末端アミノ酸はブロックされており、第3図に示すアミノ酸配列を有する。もう1つのポリペプチドの分子量は約8,000であり、第3図に示すアミノ酸配列を有する。

25,000ダルトンの蛋白(ここではA4蛋白又はA4抗原と称する)は、エイメリア・テネラ(*Eimeria tenella*)のスボロキストより得られた。この蛋白はイー・テネラ(*E. tenella*)より得られたが、他の多くの方法(例えば組み換えDN技術又は全有機合成)によつても調製できる。従つて本発明はイー・テネラ(*E. tenella*)から直接得られる蛋白に限定されず、調製法に関係なく蛋白それ自身を包含する。A4蛋白をイー・テネラ(*E. tenella*)のスボロキスト膜蛋白のヨード化で放射標識すると、オートラジオグラフィで検出し還元条件下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)(24)で決定したヨード化蛋白の見掛けの分子量は17,000である。この還元条件下では8,000ダルトンのポリペプチドは17,000ダルトンのポリペプチ

これらのアミノ酸配列の存在は完全なアミノ酸配列(第1図、第3図)を解明することにより確認された。この蛋白のN-末端アミノ酸がブロックされていることも又N-末端グルタミン分子の存在を示す完全なアミノ酸配列により支持されている。このグルタミン残基は環状化してピロリドンカルボン酸を生成することが知られている。

完全なアミノ酸配列に基づくA4蛋白の真の分子量は約25,000であり、非還元条件下でのSDS-PAGEによる見掛けの分子量は約21,000-23,000である。 β -メルカプトエタノールで還元するとこの2つのポリペプチドはSDS-PAGE(24)で観察できる。従つてA4蛋白は、お互いにジスルフィド結合で結合した2つのポリペプチド(17,000ダルトンのペプチドと8,000ダルトンのペプチド)より成る。17,000ダルトンのペプチドの完全なアミノ酸配列と8,000ダルトンのペプチドの部分的なアミノ酸配列は微量配列決定法により決定された。こうして決定された配列は、蛋白を暗号化する染色体DNAから

Dから分離され、オートラジオグラフィで検出されない。リグレイ(Wrigley)の方法(45)で測定したA4蛋白の等電点は約5.2である。この蛋白の17,000ダルトン成分のN-末端アミノ酸はブロックされている。この完全なアミノ酸配列がわかるまでは微量配列決定法で特化され、その中に下記のアミノ酸配列を有することが判明した:

1	5	10
Ala Val Lys Leu Thr Gly Asn Phe Ala Tyr		
11	15	20
Tyr Pro Val Thr Asp Gly Lys Lys Glu Cys		
21	25	30
Ser Asp Ala Val Glu Tyr Trp Lys Gly Gly		
31	35	
Leu Ser Gln Phe Asn		
	そして	
1	5	10
Thr Leu Trp Lys Thr Glu Ile Cys Pro Lys		
11	15	20
Val Leu Gly Gly Gly Arg Ser Arg Asn Val		
21		
Thr Glu		

別に決定された配列と一致する。

本発明は又、A4蛋白内に存在するアミノ酸配列を含み、焼においてエイメリア・テネラ(*Eimeria tenella*)又はエイメリア・ネカトリックス(*Eimeria necatrix*)による感染に対する防御能を与える免疫応答を誘導することのできる、精製した抗原性蛋白に関する。このようなポリペプチドは、A4蛋白の抗原決定基を含有し免疫応答を誘導できる全てのアミノ酸配列を含む。

このような2つのポリペプチドを含有する調製物が得られた。この調製物は、還元条件下のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、見掛けの分子量がそれぞれ約11,500と約6,500のポリペプチドがその中に存在することにより特徴づけられた。これらの調製物は免疫学的にA4蛋白に由来することが同定された。

A4蛋白に存在するアミノ酸配列を含む抗原性ポリペプチドは種々の方法により作ることができる。例えば、化学的又は酵素的に合成したり、組み換えDNA法で作成したり、A4蛋白より調製

したり、又はイー・テネラ (*E. tenella*) のスポロキスト又は稚虫から調製される。ここで用いられる「抗原性ポリペプチド」という語は、還元条件下の SDS-PAGE に基づく見掛けの分子量を有するポリペプチドの調製物内に存在することを特徴とする、ここに記載する非還元条件下で調製される調製物を含むものとする。このような調製物中にある時は、このポリペプチドは1つ以上の他の成分に結合している。例えば1つ以上のジスルフィド結合により他のポリペプチドに、又はポリペプチド内の2つ以上の領域が例えばジスルフィド結合によりお互いに結合している。還元条件下での SDS-PAGE で見掛けの分子量が 17,000 以下のポリペプチドがその中に存在することを特徴とする調製物についても、このような調製物は完全な A4 蛋白内のアミノ酸配列を含有するが、蛋白全体を含有しないという仮定で、この調製物を記述するのに「断片」という語を用いる。さらに A4 蛋白の蛋白分解的消化により得られるアミノ酸を記述するのに「断片」という

を用いる免疫沈降法又は免疫吸着クロマトグラフィーによるイー・テネラ (*E. tenella*) のスポロキスト膜蛋白の抽出物から別に回収することもできる。モノクローナル抗体 Pta 7.2 A4/4 は、アメリカンタイプカルチャーコレクション (American Type Culture Collection) (Rockville, Maryland, U.S.A. 20852) に ATCC 4839 561 で寄託されたマウスのハイブリドーマ細胞株により産生される。この寄託は「微生物の寄託の国際的とりきめに関するブダペスト条約」(the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms) の規定に従ってなされた。

A4 蛋白の 17,000 ダルトンのポリペプチドは、A4 蛋白に用いた方法と同じ方法により調製される。次に (例えば DEAE-セルロースによる) イオン交換クロマトグラフィーによる部分的生成に続いて還元条件下で調製 SDS-電気泳動を行なうことにより 17,000 ダルトンのポリペプチドは別に回収される。

語を用いる。

A4 蛋白のアミノ酸配列内に含まれるアミノ酸配列以外に、1つ以上の物質 (例えばデキストランのような多糖類、又は他のアミノ酸配列、即ち第3図に示すアミノ酸配列に含まれていないアミノ酸配列) を含有することもある。

本発明は又 A4 蛋白の調製法にも関する。本法ではスポロキスト膜蛋白を可溶化するためにプロテアーゼ存在下で適当な非還元条件下でイー・テネラ (*E. tenella*) のスポロキストを界面活性剤と接触させる。次に蛋白を分離生成する方法を用いて、この蛋白を可溶化したスポロキスト膜蛋白から分離して回収する。これらの方法は本特許の關係する当業者には公知であるが、例としては可溶化したスポロキスト膜の (例えば DEAE-セルロースによる) イオン交換クロマトグラフィー及びハイドロキシアパタイト HPLC による部分的生成がある。

又は A4 蛋白に対して作成したモノクローナル抗体 (例えばモノクローナル抗体 Pta 7.2 A4/4)

11,500 ダルトンの抗原性ポリペプチドを調製するためには、適切な還元剤 (例えば 8-ヒドロキシキノリン) の存在下でイー・テネラ (*E. tenella*) のスポロキストをフェノールに接触させて、スポロキスト膜蛋白を抽出する。次に適当な抗体 (たとえばモノクローナル抗体 Pta 7.2 A4/4) を用いる免疫沈降法又は免疫親和性クロマトグラフィーにより抽出したポリペプチドを回収する。6,500 ダルトンの抗原性ポリペプチドは、トリプシンタウロデオキシコレートで脱滅させた稚虫 (9) を界面活性剤に接触させて蛋白を可溶化して調製する。次に再び適当な抗体 (たとえばモノクローナル抗体 Pta 7.2 A4/4) を用いる免疫沈降法又は免疫親和性クロマトグラフィーにより、可溶化し脱滅した蛋白からポリペプチドを回収する。

組み換え DNA の技術は、25,000 ダルトンの A4 蛋白、その 17,000 ダルトンのポリペプチド又は本発明の種々の抗原性蛋白を調製するのに用いられる。この方法は A4 蛋白又はポリペ

チドを暗号化するDNA分子を調製し適当な発現ベクター（たとえば λ PL又はlacプロモーター）を用いて調製する。こうして得られる発現ベクターを、次に適当な条件化でたとえば大腸菌（*E. coli*）のような適当な宿主に挿入してDNAを発現させ蛋白又はポリペプチドを産生させてからこれを回収する。

胞子形成中の色々な時期に、スボロキストよりメッセンジャーRNAが単離できる。次にこのメッセンジャーRNAをインビトロ（*in vitro*）（32）又はインビボ（*in vivo*）系で翻訳させる。この翻訳生成物を次にモノクローナル抗体（Pin 7.2 A4/4）又は抗種虫腸血清を用いて免疫沈降させる。A4抗原を暗号化するこのmRNA調製物を用いて2本鎖cDNAを産生させる。次に、cDNAを適当なクローニングベクターに挿入し、大腸菌を形質転換させてcDNAライブラリーを作成する。次にこのcDNAライブラリーを放射標識したオリゴヌクレオチドプローブを用いるコロニーハイブリダイゼーション法によりスクリーニングする。この

の分泌性又は膜性蛋白のアミノ末端に典型的に見られる「シグナル」配列を暗号化している。

本発明は、有効な免疫量のA4抗原、抗原性ポリペプチド又は本発明の他の抗原（11,500ダルトン又は6,500ダルトンのポリペプチドを含む。しかしこれらに限定されない）を鳩に投与することより成る、鳩においてエイメリア・テネラ（*Eimeria tenella*）又はエイメリア・ネカトリックス（*Eimeria necatrix*）による感染に対し能動免疫を与える方法を包含する。この方法により免疫されていない鳩に能動免疫が付与される。さらにイー・テネラ（*E. tenella*）またはイー・ネカトリックス（*E. necatrix*）に接触した鳩の比較的低レベルの免疫を増強させたり、追加ワクチンとしても用いられる。

A4抗原又は本発明の抗原性ポリペプチドの任意のものを公知のいかなる方法により鳩に投与してもよい。好ましくは頭の後部に皮下注射又は筋肉注射して投与する。有効な免疫量より成る抗原量とは、約0.1マイクログラムから約1mgまでの

オリゴヌクレオチドプローブはA4抗原の

17,000ダルトンポリペプチド成分のアミノ酸配列に基づいて作成する。17,000ダルトンポリペプチドのヌクレオチド配列を含有する細菌のコロニーからベクターDNAを単離して、配列を決定したコクシジウムDNAに挿入する（34,44）。

あるいは、イー・テネラ（*E. tenella*）のゲノムDNAを単離してEco RIのような制限酵素で切断する。この制限酵素断片を適当なクローニングベクター（たとえば λ gt10又は λ B）に結合させゲノムライブラリーを作つた。次にこのゲノムライブラリーをcDNAライブラリーで記載したようにブランクハイブリダイゼーション法によりスクリーニングした。A4蛋白を暗号化するゲノムクローンを単離した結果、このDNA配列は、連続的なヌクレオチド配列（第3図）に暗号化されるA4蛋白の2つのペプチドを示した。したがって17,000ダルトン及び8,000ダルトンペプチドは単一の25,000ダルトンペプチドの蛋白分解により得られる。さらにこのDNA配列は多く

任意の量である。抗原量は約10マイクログラムより多いことが好ましい。好適な抗原量は体重1キログラム当たり約500マイクログラムである。あるいは経口的（たとえばカプセル）又は好ましくは注射（皮下、皮内、又は好ましくは筋肉注射）により投与する。投与方法として注射を用いる場合は、薬理学的に許容される任意の担体を使用できる。適当な担体としては、0.01 - 0.1 M（好ましくは0.05 M）のリン酸緩衝液または0.8パーセントの食塩水がある。

本発明の有効免疫量の抗原性物質（即ちA4抗原、又は本発明の抗原性ポリペプチド又は他の抗原）、及び適当な担体より成る、エイメリア・テネラ（*Eimeria tenella*）又はエイメリア・ネカトリックス（*Eimeria necatrix*）の感染に対し鳩に能動免疫を与えるワクチンが与えられる。好ましくはワクチン内の有効な免疫量の抗原性物質とは鳩の体重1羽当たり約0.1マイクログラムを超える量である。

さらに担体は好ましくは保存剤を含有する。特

に好適な保存剤は、抗細菌活性及び抗かび活性を有するチメロサル（ソディウムエチルマーキュリチオサリチレート）である。ワクチン内のチメロサルの最終濃度は好ましくは10パーセントである。

さらに担体は又免疫増強剤（イムノポテンシエーター）を含有することが好ましい。当該分野において種々の免疫増強剤が知られている。現在使用されているアジュバントは94% Drakeol 6-VR, 5% Arlacel A, 1% Tween-80である。Arlacel Aはマナイドモノオレエート（サンドリア社）である。これは刺激薬であり抗原と組み合わせた時強い免疫増強作用を示す。Drakeol 6-VRはアレルギー誘発作用の小さい軽鉱物油製品（ペンレコ社）である。Tween-80はポリオキシエチルソルビタンのモノオレイン酸誘導体であり、界面活性作用を有する。他の適当な担体又は免疫増強剤としては、硫酸アルミニウムカリウム水酸化アルミニウム、リンフォカイン及び油中水懸濁液がある。

は前記したハイブリドーマ細胞株 ATCC 46H B 8561により産生されるモノクローナル抗体 Pta 7.2 A4/4 である。

A4抗原に対するモノクローナル抗体又はその抗原性断片に対するモノクローナル抗体（たとえば Pta 7.2 A4/4）の有効量を鶏に投与することにより、鶏にイー・テネラ（*E. tenella*）またはイー・ネカトリックス（*E. necatrix*）の感染に対し受動免疫を与えることができる。この目的に有用な組成物は、有効な防御量の適当なモノクローナル抗体（たとえばモノクローナル抗体 Pta 7.2 A4/4）及び適当な担体より成る。上記の組成物は十分な量のモノクローナル抗体より成り、経口的に投与した時感染に対する防御能を与える。抗体の典型的な投与量は、水溶液又は凍結乾燥の形で1日1羽当たり約100マイクログラムである。この組成物は好ましくは水を供給する意味で水溶液の形で与える。この抗体を0.15Mリン酸緩衝化生理食塩水、pH7（0.0001パーセントのチメロサル含有）に、最終の蛋白含有量1

このようなワクチンの適当な量を投与することにより、イー・テネラ（*E. tenella*）またはイー・ネカトリックス（*E. necatrix*）の感染から鶏を防御することができる。1回投与分の抗原性物質の量は、ワクチンを投与した動物において抗原性物質に対する抗体を産生するのに十分な量でなければ成らない。抗体産生及び防御能を基準にして測定した十分な免疫応答能を与えるためには、投与量当たりの抗原性物質の量は、ワクチンを投与する動物の体重1kg当たり20.0マイクログラムを超えることが好ましい。従つて50グラムの1日令のヒヨコに対する抗原性物質の量は約1.0マイクログラムを超える量である。現在の所、抗原性物質10マイクログラムを含有するワクチンが好ましい。一般的に抗原は約0.002重量%から約0.2重量%のワクチンを含有し、投与容量は約0.1mlである。

本発明の他の態様は、A4蛋白に対するモノクローナル抗体と本発明の抗原性ポリペプチドに対するモノクローナル抗体を含有する。具体的態様

-100mg/mlになるように溶解させる。所期の抗体レベルを維持するためにこれを水に連続的に供給する。このような組成物の適当量を鶏に投与することが、イー・テネラ（*E. tenella*）またはイー・ネカトリックス（*E. necatrix*）による感染に対し受動免疫を与える方法である。

さらに別の態様では、A4抗原の主要な防御性構造に共通な立体的特徴を有する複合構造を、前記した抗原の代わりに用いることができる。そのような組成物の1つとしてはA4蛋白又は本発明の抗原性ポリペプチドの1つの構造の抗体に対して作った抗イデオタイプ抗体（たとえばモノクローナル抗体 Pta 7.2 A4/4）があり、この構造がそれぞれの抗原決定基に特異性を与える。この抗イデオタイプ抗体は本来それ自体がモノクローナル抗体であつてもいいし、ポリクローナル抗体として作成してもよい。前記の例では抗体 Pta 7.2 A4/4はハイブリドーマ細胞株 ATCC 46H B 8561より回収し精製して適当な担体蛋白（例えばキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）

に結合させる。精製した抗体（好ましくは精製した抗体-KLH複合体）を適当なリンパ球供与性乳動物（好ましくはBalb/C株マウス）に、好ましくはフロイント完全アジュバントのようなアジュバントと共に繰り返し注射する。免疫したマウスのリンパ球からハイブリドーマを作成する。モノクローナル抗体Pta 7.2 A4/4との反応で、A4抗原と反応するがA4抗原及びPta 7.2 A4/4以外のネズミの免疫グロブリンを認識しない抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングする。モノクローナル抗体Pta 7.2 A4/4に対する抗イデオタイプ抗体を分泌するハイブリドーマをさらに拡張しクローニングする。抗イデオタイプ抗体を産生するには、ハイブリドーマの増殖及びモノクローナル抗体の発現に適した任意の培地中で細胞を培養するか、又は宿主動物（好ましくはBalb/Cマウス）中で抗体産生ハイブリドーマを増殖させる。抗イデオタイプ抗体は又Pta 7.2 A4/4を動物に注射することにより産生される。好適な1つの方法は、精製し適当なアジュバント

本発明の抗イデオタイプ抗体の有効量を鶏に投与することにより、鶏においてエイメリア・テネラ（*Eimeria tenella*）又はエイメリア・ネカトリックス（*Eimeria necatrix*）による感染に対する能動免疫が与えられる。この目的のためのワクチンは有効な免疫量の抗イデオタイプ抗体と適当な担体よりなる。従つてこのようなワクチンの適当量を鶏に与えることにより、エイメリア・テネラ（*Eimeria tenella*）又はエイメリア・ネカトリックス（*Eimeria necatrix*）による感染に対する防御能が鶏に与えられる。

1回投与当たりの抗イデオタイプ抗体の量はワクチンを投与される動物において抗体の産生を誘発するのに充分でなければならない。抗体産生により測定する免疫応答誘導のためには、1回投与当たりの抗イデオタイプ抗体の量はワクチンを投与される鳥の体重1kg当たり50μgを超える量でなければならない。従つて1日令の50gのヒヨコに投与する抗イデオタイプ抗体の量は2.5μgとなる。普通抗イデオタイプ抗体は

（たとえば完全フロイントアジュバント）に製剤化した500マイクログラムの7.2 A4/4を適当な動物（たとえばウサギ）に繰り返し投与することである。充分注射した後適当な期間が経つてから動物から血清を採る。次に血清からたとえばセファロースのような不溶性支持体に固定化した正常マウス血清蛋白に吸着させて抗イデオタイプ抗体を回収する。こうして得られる抗血清の特異性は、モノクローナル抗体Pta 7.2 A4/4とは反応するが正常ネズミγ3(K)とは反応しないことを証明して確認する。

上記のように調製した抗イデオタイプ抗体をさらにIgGのレベルまで精製する。精製した抗イデオタイプ抗体は、抗原自身に就て記載した任意の公知の方法で投与される。

0.002重量多から、0.2重量多のワクチンを含み、投与容量は0.2ccである。

本発明の別の態様はA4蛋白を暗号化する核酸分子（たとえばDNA、cDNA、RNA又はmRNA）である。1つの実施態様は第3図に示す核酸配列を有するDNA分子である。別の実施態様は本発明の抗原性ポリペプチドの1つを暗号化するDNA分子である。

さらに別の実施態様は本発明の（たとえばA4蛋白又は前記した抗原性ポリペプチドの1つを暗号化する）核酸分子より成るクローニング媒体である。このクローニング媒体は宿主細胞（たとえば細菌宿主細胞）に含まれる。

第3図に示すアミノ酸配列を有する蛋白は、A4蛋白を暗号化する核酸分子を含むクローニング媒体を含有する宿主細胞を用いて産生される。本方法では宿主細胞を適当な条件で増殖させて、蛋白を作らせ得られた蛋白を回収する。ポリペプチドを暗号化する適当な核酸分子を用いて、抗原性ポリペプチドも同様に調製される。

宿主細胞が細菌細胞の場合、得られるA4蛋白は天然のA4蛋白と配列は同じであるが、細菌宿主での発現のため(たとえばN-末端メチオニン分子の付加、又は単一の切断されていない蛋白)アミノ酸配列又はアミノ末端が異なる。また別の実施例は、第3図に示す核酸配列を有するDNA分子を得る方法に関する。この方法はエイメリア・テネラ(*Eimeria tenella*)の接合子囊からゲノムDNAを単離し、単離したゲノムDNAから(たとえば制限酵素により)DNA断片を調製することにより成る。このDNA断片を適当なクローニングベクターに結合させる。このDNAを、第3図に示す核酸配列内に存在する核酸配列を含有する(又は相補的な)オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションさせて、適当なクローンを同定する。このクローンから、蛋白を暗号化し第3図に示す核酸配列を有するDNAを単離する。

実施例1

エイメリア・テネラの接合子囊、スポロキスト及び種虫の調製

に行なつた。外からのコクシジウムの感染を防ぐため、鶏は1日目からプレクシガラス隔離装置で育てた。感染後7日目に、シャーレイ(Shirley)のトリプシン消化法(48)により盲腸から接合子囊を集めた。孢子形成した接合子囊は代表的に24°Cで2% w/v $K_2Cr_2O_7$ 中で保存した。

スポロキストの単離 塩浮上法で残査より部分的に精製した孢子形成したイー・テネラ(*E. tenella*)の接合子囊(1×10^8)を0.1 Mのリン酸緩衝化生理食塩水、pH 7.4 (PBS)で5回洗い重クロム酸カリウム保存剤を除去した。この接合子囊は1.05% 次亜鉛素酸ナトリウム溶液中で15分間攪拌した後PBSで5回洗い次亜鉛素酸ナトリウム及び残査を除去した。最後の洗滌の後きれいな接合子囊を10 mlのPBSに浮遊させた。浮遊した接合子囊を等量のガラスビーズ(1.0 - 1.05 mm)とともに攪拌して機械的に破壊した。ガラスビールのカラム中を通過させて放出されたスポロキストを接合子囊膜より精製し、4°C、10,000 RPMで10分間遠心分離し10 mlのリ

コクシジウム エイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*) の精製した野外分離株はオボーン(Auburn)大学のアレンドガー(Allen Edgar)博士より入手した。このイー・テネラ(*E. tenella*)の純度は接合子囊の特徴と感染した腸組織の組織診により確認した。接合子囊の大きさと形のインデックスはイー・テネラ(*E. tenella*)の範囲内にあつた。

ジョンソンとレイド(Johnson and Reid)の方法(20)により病変のスコアづけを行なつた。感染した鳥の病変はイー・テネラ(*E. tenella*)に典型的なものであつた。病変は盲腸に限られており、多量の出血と組織の損傷があつた。5日後の組織診では盲腸の表皮下により大きな第2世代のシメントが見られた。死亡数は重症の感染に共通のものであつた(15,000)。定期的に単一の接合子囊のクローニングをおこない、イー・テネラ(*E. tenella*)分離株の純度を確認した。

接合子囊の繁殖 4から6週令のBPFホワイトレッグホーンチキンでこの分離株の純粋培養を普通

ン酸緩衝化生理食塩水に再浮遊させた。

種虫の調製 孢子形成した時期の新しい接合子囊を、塩浮上法、洗滌の繰り返し、及び1.05% 次亜鉛素酸ナトリウムによる処理により洗した。ガラスビーズ(1.0 - 1.05 mm)で接合子囊を機械的に破壊してスポロキストを遊離させた。種虫を脱糞させるためにスポロキストをトリプシンとタウロデオキシコール酸(それぞれ0.25及び0.50% w/v)と共に41°Cで1時間インキュベートした。こうしてえられた種虫を洗滌して遠心分離による脱糞液から遊離させ、Hank's培地に再浮遊させた。新鮮なHank's培地を用いて種虫を希釈し使用濃度を調製した。

実施例2

ハイブリドーマの生成、同定及び特徴化モノクローナル抗体

モノクローナル抗体はバンドイセンとウエストストーン(Vandeusen and Whetstone)の方法(55)を用いて作つた。簡単に説明すると、Balb/c ByJマウスを $10^6 - 10^7$ の完全なイー・

テネラ (*E. tenella*) の種虫で繰り返し免疫した完全な種虫の最後の注射の3日後に、ランダムに選んだマウスを絞し脾臓を摘出した。脾臓の繊維組織から脾細胞を分離し、洗滌した細胞をネズミの形質細胞腫細胞株 SP 2 / OM に融合させた。

微量中和定置法

微量中和定置法はヒヨコの初期の腎臓の培養細胞株で行なつた。1 から 2 週令のヒヨコを殺し無菌的に腎臓摘出を行なつた。腎臓をトリプシン処理し、細胞を 5 の % 熱非活性化した牛胎児血清を補った Earle's LAM 培地に約 10^6 / ウェルの濃度でプレートに加えた。培養液を 5 % CO₂ 中で 41°C で維持した。培養細胞のコンフルエンス (confluency) が約 50 % に達した時、プレートの全てのウェルに 50 μ l のハイブリドーマ又は対照試料を加えた。次に Earle's 培地 50 μ l 中 2.3×10^6 の種虫をプレートの全てのウェルに加えた。12 - 16 時間後培養上澄液を 2 % の熱非活性化した牛胎児血清を含有する Earle's LAM 培地と交換した。感染後 40 - 44 時間後に培養を止

して作成した数千のハイブリドーマのうち、24 個が種虫段階に対して中和抗体を産生していた。試験したハイブリドーマの全てが膜結合抗原を認識する抗体を産生していたが、1つのハイブリドーマの産生する抗体のみが内部膜抗原を認識した。他のモノクローナル抗体は細胞膜に関連した抗原を認識していた。

それぞれの細胞株の最初のクローニングの後幾つかの上澄液についてインビトロの中和力価を比較した。2つの株の上澄液が最大のイー・テネラ (*E. tenella*) の種虫中和能を示した。試験した各上澄液の抗体含量を測定した結果、種虫を中和するのに 2 番目に強い抗体は 1 番強い抗体 (Ptn 7.2 A 4 とする) の 20 倍近い量が必要であつた。具体的には、イー・テネラ (*E. tenella*) を中和するのに必要な Ptn 7.2 A 4 抗体の量は約 3.5×10^5 分子 / 種虫であつた。

実施例 3

中和モノクローナル抗体及びエイメリアテネラ種虫特異的鶏抗血清により認識されるイー・テネラ

めた。この時培養上澄液を捨てた。次に 5 % 氷酢酸で酸性化したメタノールを添加して細胞をプレートに固定した。固定した培養物を 0.1 % トリジンブルーで染色してから観察した。増殖生殖の阻害の程度によりウエルのスコアづけを行なつた。

間接免疫蛍光抗体法

イー・テネラ (*E. tenella*) の種虫 (約 1×10^6 / ウェル) を用いて IFA スライドを調製した。スライドを空気乾燥してから、1 % DSA 10 μ l を各ウェルに加えた。BSA 添加 5 分後 20 μ l の試験上澄液を加えた。上澄液を 37°C で 20 分間インキュベーションした後、0.0005 % Tween - 20 を含む 0.15 M PBS (PBS - Tween) で 3 回洗滌した。試料にけい光色素結合ウサギ抗マウス抗体 (PBS で 1 : 40 に希釈してある) を添加し 37°C で 20 分間インキュベーションした。結合物を PBS - Tween で 3 回洗滌してから包埋剤とカベースリップを加えた。

結 果

エイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*) に対

(*E. tenella*) の抗原の同定

エイメリア蛋白の I 標識

全部で 2×10^8 のイー・テネラ (*E. tenella*) の接合子囊をヨード化のために処理した。各場合に塩浮上させ次亜鉛酸ナトリウム処理した接合子囊を、ガラスビーズで破壊しガラスウールカラムに通してスポロキストを精製した。プロテアーゼ阻害剤: 0.1 mM フェニルメチルсульフォニルフルオリド (PMSF)、0.1 mM N - トシル - L - フェニルアラニンクロロメチルケトン (TPCK)、1 mM N - α - P - トシル - L - リジンクロロメチルケトン (TLOK) 及び 10 KIU / ml アプロタニンの存在下で 1 ml の 10 mM リン酸ナトリウム、0.15 M NaCl、pH 7.2 (PBS) 中でガラスビーズと共に、機械的破壊によりスポロキストの半分からスポロキスト膜を調製した。残りのスポロキストはトリプシン及びタウロデオキシコール酸 (総量 = 1 ml) で処理して種虫を脱糞させた。両方の調製物を 4°C で 45,000 RPM で 45 分間遠心分離してペレットにして 1 ml のリン酸緩衝化生

理食塩水 (pH 7.4) (PBS) に再浮遊させた。超遠心の前に PBS と 1 mM の PMSF で洗滌してスポロキストから全てのトリプシン-デオキシコレート残渣を除去するように注意した。

40 μ g の 10 DDGEN (1, 3, 4, 6-テトラクロロ-3 α , 6 α -ジフエニルグリコウリル) 固相ヨード化試薬で被覆したガラスシンチレーションバイアルに試料を 1 ml 加え、窒素ガスで乾燥させ、PBS で洗滌した。各チューブに 0.5 mCi の 125 I を添加し、試料を氷上で 20 分間インキュベーションさせた。次に 100 μ l の KI (1 M) を各チューブに添加し最終濃度を 100 mM にし、氷上でさらに 15 分間反応させた。次に種虫とスポロキストの調製物を 5 mM KI を含有する PBS で 7 ml に希釈し、4°C で 45,000 RPM で 45 分間遠心分離してペレットにした。

スポロキストと種虫膜蛋白の抽出

上記の高速遠心分離によりペレット化した 125 I 標識したスポロキストと種虫を 1 ml の蛋白抽出緩衝液 (20 mM トリス-HCl, pH 7.5; 50 mM

MgCl₂; 25 mM NaCl, 1% NP40, 1 mM PMSF, 0.1 mM TPCK, 1 mM TLCK 及び 10 KIU/ml アプロタニン) に再浮遊させた。この浮遊液をさらに 30 分間氷上で時々ボルテックスしながらインキュベーションする。微量遠心機 (Microfuge) 中で遠心分離して、界面活性剤で可溶化した蛋白から不溶性物質を除いた。上澄液を -70°C で 1 晩保存した。

125 I 蛋白の沈降

各試料の 10 μ l を 90 μ l の 5 mM KI 中に希釈した。希釈した各試料の 10 μ l を 1 ml の 5% トリクロロ酢酸 (TCA)、25 μ l の BSA (10 mg/ml) 及び 5 mM KI を含有する溶液に添加し、氷の上で 30 分間インキュベーションした。沈降した試料をガラスファイバーフィルターでろ過して集め、5 ml の 5% TCA、5 mM KI で 2 回洗滌し、5 ml の 95% エタノールで 3 回洗滌し (いずれも 0°C)、シンチレーションカウンターで計測した。
総 125 I 標識 E. tenella (E. tenella) 画分の SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS - PAGE)

総 125 I 標識 スポロキスト、種虫及び可溶性膜蛋白及び免疫沈降した蛋白 (下記参照) を、120 \times 100 \times 0.75 mm、5 - 25% の指数濃度勾配の SDS - ポリアクリルアミドゲルで 20 mA で 3 時間解析した。ゲルを乾燥させ、-70°C で X 線フィルムを感光するのに用いた。

染色用のゲルを銀染色して観察した。

モノクローナル抗体による免疫沈降

モノクローナル抗体を含有するハイブリドーマ上澄液 50 μ l を、25 μ l のモノクローナル抗体希釈緩衝液 (MAB - DIL) (50 mM トリス-HCl, pH 8.6; 150 mM NaCl; 0.1% NP40; 0.1% BSA, RIA グレード; 1 mM TLCK; 1 mM PMSF, 10 KIU/ml アプロタニン) に添加した。次に 125 I 標識蛋白を加え、チューブを激しく攪拌し 4°C で 1 晩インキュベーションした。ウサギ抗マウス Ig 血清 (IgA、IgG、IgM に反応する) を MAB - DIL で 1 : 2 に希釈し、各免疫沈降チューブに 10 μ l 加え、4°C で 1 時間インキュベーションした。モノクローナル抗体洗滌緩衝液、pH

8.6 (MABW) (50 mM トリス-HCl, 0.05% NP40, 0.05% トリトン X-100, 150 mM NaCl, 0.02% NaN₃, 5 mM KJ) でプロテイン A - セファロース (10% w/v) を 1 : 4 に希釈し、400 μ l を各チューブに加えた。チューブをゆすり動かしながら 4°C で 1 時間インキュベーションした。免疫沈降生成物を冷 MABW で 2 回洗った後、室温で MABW で洗った。ペレットを 50 μ l の 1.5 \times SDS - PAGE 試料緩衝液 (24) に再浮遊し、5 分間沸騰し、微量遠心をしてセファロースを除去した。上澄液を計測し SDS - PAGE で解析した。

E. tenella (E. tenella) 種虫特異抗血清

いくつかの例外を除いては、モノクローナル抗体による免疫沈降法の部分と同じ方法を用いた。90 μ l の抗体希釈緩衝液 (AB - DIL) (10 mM トリス-HCl, pH 7.5; 0.1% BSA RIA グレード; 1 mM PMSF; 1 mM TLCK; 10 KIU/ml アプロタニン) で血清を 1 : 10 に希釈してから 20 μ l の 125 I 標識蛋白に添加した。抗体洗滌緩衝液の

組成は10 mM トリス-HCl、pH 7.5、0.1 % BSA RIA グレード；1 mM PMSF；1 mM TLOK、10 KIU/ml アプロチニン；0.05 % NP 40；0.05 % トリトン X-100、±5 mM KI である。

イー・テネラ (E. tenella) 抗原の Ptn 7.2 A4/4 モノクローナル抗体による免疫沈降の結果

表面標識したイー・テネラ (E. tenella) 種虫調製物は2つの主要なヨード化ポリペプチド(1つは6,500 ダルトンそしてもう1つは25,000 ダルトン)のところで濃縮されている。6,500 ダルトンのペプチドは、スポロキスト調製物中の17,000 分子量ポリペプチドのプロテアーゼ消化断片であることはすでにわかっており、モノクローナル抗体 Ptn 7.2 A4/4 で容易かつ特異的に免疫沈降する。スポロキストの膜は種々の分子量を有するいくつかの蛋白が存在するが、17,000 ダルトンと27,000 ダルトンのポリペプチドが濃縮されている。125I-標識スポロキスト膜蛋白で免疫沈降させると、モノクローナル抗体 Ptn 7.2 A4/4 により認識される唯一の抗原は、

ペプチドを分析した条件と同じ条件で、ジスルフィド結合により結合しているポリペプチドを分離した。しかしジスルフィド結合の還元は、スポロキスト及び種虫膜蛋白のウエスタンブロットでのA4反応性を破壊してしまう。非還元条件下でヨード化したスポロキスト及び種虫膜蛋白をSDS-PAGEで分析すると、主要な放射性標識物は見かけの分子量21-23,000のところに移動する。さらにこの21-23,000 ダルトンの分子種はウエスタンブロットティング(マウスIgG用のVectastain ABCキット、Vector Labs, Burlingame, CA)でモノクローナル抗体A4と反応する。これらの結果はスポロキスト膜の17,000 ダルトンポリペプチド及び種虫膜の6,500 ダルトンポリペプチドは、A4抗原内で他のポリペプチドと複合体を作っていることを示唆している。A4抗原内のこの別のポリペプチドが観察されなかつたという事実は、このポリペプチドはヨード化され得るチロシンを1つも含まない(第5図及び第6図のA4抗原の8,000 ダル

17,000 分子量のポリペプチド(そのアミノ酸配列は第5図に示す)である。

イー・テネラ (E. tenella) 種虫特異鶏抗血清によるイー・テネラ (E. tenella) の免疫沈降の結果

ハイブリドーマ細胞株 BB 8561 由来のモノクローナル抗体と同様に17,000 ダルトンのポリペプチドを認識する可否を調べるために、死んだイー・テネラ (E. tenella) 種虫を繰り返し静脈注射して免疫した鶏の血清を用いた。

ヨード化したスポロキスト及び種虫膜蛋白からそれぞれ17,000 及び6,500 ダルトンのポリペプチドが、上記したように免疫した鶏の抗血清により特異的に免疫沈降された。特異的病原体を含まない対照の鶏の血清はイー・テネラ (E. tenella) 蛋白を認識しないようである。

Ptn 7.2 A4/4 モノクローナル抗体によるイー・テネラ (E. tenella) 抗原のウエスタンブロットの結果

上記のSDS-PAGEで免疫沈降したヨード化ポリ

トンのポリペプチド成分の説明参照)という観察により説明される。

実施例4

エイメリア・テネラ (Eimeria tenella) A4 抗原とその断片の精製、同定及び特徴化

A4 抗原の17,000 ダルトンのペプチド成分の精製

孢子形成したイー・テネラ (E. tenella) の接合子嚢を10⁸個当たり10 mlのPBSに再浮遊し、等量のガラスビーズで撹拌し破壊した。遠心分離(100,000 × g、60分、4℃)により膜を単離し、1 % NP-40、10 mM トリス(pH 7.5)、25 mM NaCl、1 mM PMSF、1 mM TLOK、0.1 mM TPCKそして10 KIU/ml アプロチニン中で蛋白を可溶化させた。さらに100,000 × g(60分、4℃)遠心して不溶性の物質をペレット化した。この蛋白を、10 mM トリス(pH 7.7)、0.05 % NP-40で平衡化したDEAE-セルロースカラムに吸着させた後、50 mM NaClを含有するこの緩衝液で洗った。200 mM NaClを含有す

る緩衝液で洗滌した後、17,000ダルトンペプチドをアセトン沈澱で濃縮し沈澱物を添加用緩衝液に再浮遊し、沸騰させSDS - ポリアクリルアミド(15%)で電気泳動をした。この実験及び他の実験に使用した通常のSDS - PAGE試料用緩衝液は62.5 mM トリス - HCl (pH 6.8)、2% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム、10% (w/v) グリセロール及び0.001% (w/v) ブロムフェノールブルーを含有した。SDS - PAGEの実験で非還元状態が必要な時以外はこの緩衝液は5% (w/v) β -メルカプトエタノールを含有していた。染色(クマジーブルー又はHCl)して17,000ダルトンのポリペプチドを同定した。適当な領域を切り取り、蛋白を電気溶出させアセトン沈澱で濃縮した。これらの方法は蛋白を変性させ、ジスルフィド結合で結合しているペプチドは分離されてしまう。この方法で精製された17,000ダルトンのペプチドは基本的に純粋であつた。

A 4 抗原の精製と特徴化

この方法で精製される17,000ダルトンポリペプチドを含む画分は、第2の8,000ダルトンのペプチドも含んでいた。このペプチドは17,000ダルトンのポリペプチドにジスルフィド結合で結合しているようである。17,000ダルトンのペプチドを含む画分をモノクローナル抗体A 4で免疫沈降させ、沈降した蛋白を(上記の)還元条件下でゲル電気泳動で分析すると、17,000と8,000ダルトンのポリペプチド共に免疫沈降されるようである。従つて強い還元条件下でないとこの2つのペプチドは電気泳動上に出現してこないため、スプロキストの膜蛋白の中で8,000ダルトンと17,000ダルトンのポリペプチドは(おそらくシステインによつて)ジスルフィド結合で結合しているようである。非還元条件下ではA 4反応性分子種は見かけの分子量が21-23,000のところに易動する。

A 4 抗原の11,500ダルトン断片の調製

イー・テネラ(*E. tenella*)スプロキスト膜を前記したように調製し、10mlのPBS + 1%ト

ゲル電気泳動で精製するかわりにDEAE - セルロースカラムから得られたスプロキスト膜蛋白を10 mM トリス HCl, pH 8、0.05% NP - 40で透析し、この緩衝液で平衡化させたDEAE - HPLCカラム(BioRad)にかけた。同じ緩衝液中のNaClの濃度勾配でカラムを展開した。17,000ダルトンのポリペプチド(ゲル電気泳動上の易動度により同定される)は200 mM NaClで溶出する物質中に見出された。この蛋白を含む画分を、30 mM リン酸カリウム、pH 6.5、0.05% Zwittergent 3 - 12 (Calbiochem - Behring, LaJolla, CA) 0.1 mM ジチオスレイトールで平衡化させたハイドロキシアパタイトカラム(BPHT - BioRad)にかけた。このカラムを平衡化緩衝液で洗い、0.05% Zwittergentと0.1 mM ジチオスレイトールを含むリン酸カリウム濃度勾配(0 - 300 mM)で展開させた。この17,000ダルトンのポリペプチド(上記のゲル電気泳動で同定した)は約90 mM リン酸カリウム中に出現する物質中にあつた。

リトンX - 100中に浮遊させた。この10mlの膜浮遊液に、0.1% 8 - ヒドロキシキノリンを含む80% フェノールを10ml加えた。この浮遊液を最少のスピードで3分間ボルテックスし、4000 RPMで10分間遠心分離した。フェノールと懸集した界面を取つて、5倍量のメタノール中100mMの酢酸アンモニウムで希釈し-20℃で1晩沈降させた。アセトンで2回洗つてから不溶性蛋白を0.5% SDS中で8時間攪拌し、4℃、20,000 RPMで1時間遠心して不溶性物質を除いた。この試料をA 4501 - X 8混合床樹脂(1g/500ml)を含むPB8 (pH 7.2)で透析した。次にモノクローナル抗体Ptn 7.2 A4/4を用いて上澄液からA 4抗原の11,500ダルトン断片を免疫吸着させた。マイクロタイター ELISAによりこのポリペプチドはPtn 7.2 A4/4モノクローナル抗体に反応することが証明された。

マイクロタイタープレート ELISA用に96穴のポリスチレンプレート(Immulon II)を10 mM グリシン緩衝化生理食塩水、pH 9.6中の抗原で感

作し、37℃で1晩インキュベーションした。穴を0.0005% Tween-20を含む0.15M PBSで洗いPBS-Tween中3%のBSAでブロックし、再び洗滌し、PBSで希釈したPtn 7.2 A 4/4モノクローナル抗体と共にインキュベーションした。再び穴を洗い、PBSで希釈したペルオキシダーゼ結合ウサギ抗マウスIgG血清と共にインキュベーションした。再び穴を洗い、H₂O₂の存在下で基質(2,2'-アジノージ-[3-エチル-ベンズチアゾリン]スルホネート)と共にインキュベーションした。発色は15分後にDynatech MR-580マイクロタイタープレートELISAリーダーで測定した。

A 4抗原の6,500ダルトン断片の調製

イー・テネラ(*E. tenella*)のスポロキストを調製した。次に0.25%トリプシンと0.5%タクロデオキシコール酸を含有する溶液中でスポロキストを41℃で1時間インキュベーションして種虫を放出させる。1mM PMSFを含むPBS中で種虫を数回洗い、ガラスビーズで種虫を機械的に破

断片の正確な位置は不明である。

実施例5

A 4抗原の17,000及び8,000ダルトンペプチド成分のアミノ酸配列

A 4抗原の17,000ダルトンペプチド成分のアミノ酸配列

N-末端アミノ酸がプロットされていた(すなわちエドマン分解ができなかつた(12))ため、17,000ダルトンペプチドのアミノ酸配列の決定は複雑であつた。この問題を回避するため種々の化学物質及び酵素を用いて蛋白を還元しアルキル化し次に消化した。得られたペプチドを逆相HPLC(17)で精製した。17,000ダルトンペプチド又はA 4抗原をCNBr(CN)、V8プロテアーゼ(V)、キモトリプシン(OB)及びArg-O(R)で消化した。

プロテアーゼで消化する前に17,000ダルトンポリペプチド又はA 4抗原を30mMジチオスレイトール、6M Guanidinium-HCl(pH 8)で室温で1時間処理した。最終濃度が100mMになるよ

うにして種虫膜を調製した。A 4抗原のこの6,500ダルトン断片は、Ptn 7.2 A 4/4モノクローナル抗体又はイー・テネラ(*E. tenella*)種虫特異的殺抗血清で免疫沈降された。

A 4抗原の種々のペプチドと断片の関係

第5図及び第6図に示すようにA 4抗原を暗号化する遺伝子は25,000ダルトン蛋白を暗号化している。次にこの蛋白を蛋白分解処理をすると、ジスルフィド結合で結合した17,000ダルトンと8,000ダルトンのペプチドが生成する。A 4抗原の11,500ダルトン及び6,500ダルトンの断片は共に、17,000ダルトンペプチドの断片であると考えられる。6,500ダルトン断片は充分にヨード標識されるが8,000ダルトンペプチドはヨード化されないので、本発明者らは6,500ダルトン断片は17,000ダルトンペプチドに由来すると結論づけている。11,500ダルトン断片は還元SDS-PAGEで見られるので17,000ダルトンペプチドに由来するはずである。17,000ダルトンペプチド内のこの2つの

うに固体ヨードアセトアミドを添加し、pHを再び8に調整し室温で1時間インキュベーションした。還元及びアルキル化した後、0.1M MOPS、pH 7.5、0.1% SDSで平衡化させたP6DG(Bio-Rad、Richmond Co)スピンカラムか又はHPLCを用いて試薬を除き試料を精製した。

CNBr分解のために蛋白試料を70%酸液中1%のCNBrで4℃で20時間処理した。試料をセイバントスピーダグ(Bavant Speedav)遠心分離機で蒸発乾固し、0.1%トリクロロ酢酸(TFA)又は0.1% TFA、20%アセトニトリル(CH₃CN)に再溶解した。V8分解は0.1% SDS、0.1M MOPS pH 7.5で、50μg 17,000ダルトンポリペプチド:1μg V8の比で室温で2時間行なつた。分解後試料を4倍量のアセトンで-20℃で1晩沈降させた。アセトン沈降物を再溶解した。キモトリプシン消化は0.05% Zwittergent 3-12、0.1M NH₄HCO₃、pH 7.8中、50:1、17,000ダルトンペプチド:キモトリプシンの比で行なつた。ペプチド精製用に試料をTFAで酸

性化した。Arg - C 消化は 0.05% Zwittergent 3-12、0.1 M NH_4HCO_3 pH 7.8 で 15:1、17,000 ダルトンペプチド: Arg - C の比で 37°C で 2 時間行なつた。-20°C で 1 晩アセトン沈澱をするとペプチドは主にアセトン上澄液中に存在した。この上澄液を前記したように蒸発させ試料を再溶解した。Vydac C4 カラム (the Separations Group, Inc., Hesperia, CA) でペプチドを精製し、0-100% CH_3OH 勾配 (0.1% TFA 中) で溶出した。

アミノ酸配列はハンカピラー (Hunkapiller) らの方法 (16) に従いガス逆相シーケンサーを用いて決定した。

ブロッキング剤を除いて N 末端アミノ酸を直接測定した。0.1 M リン酸カリウム (pH 8.0) 10 mM EDTA、5% グリセロール、5 mM ジチオスレイトール、0.05% Zwittergent 3-12 中のピログルタメートアミノペプチダーゼ (5:1 蛋白: PAP) で 17,000 ダルトンペプチドを 37°C で 1 時間処理した。処理後直接アミノ酸配列を決定

し、N 末端アミノ酸グルタミンが還元化してプロックされた残基ピロリドンカルボン酸を形成していることが示唆された。

A4 抗原の 17,000 ダルトンペプチド成分の完全なアミノ酸配列を第 1 図に示す。

A4 抗原の 8,000 ダルトンペプチド成分の部分的アミノ酸配列

精製した 8,000 ダルトンペプチド (還元及びアルキル化により A4 抗原に由来) をエドマン配列決定を行ない、N 末端アミノ酸配列を直接決定した。N 末端の部分的部分的アミノ酸配列を以下に示す。

NH_2 - ala ala gly thr thr asp ala val ile
cys leu thr asn pro ala pro leu glu
ala arg ser gln pro phe asp asp glu

実施例 6

A4 抗原を暗号化するゲノム DNA クローンの単離と特徴化

イー・テネラ (*E. tenella*) の孢子形成した接合子囊からの DNA の単離

孢子形成した接合子囊 (5×10^8) を洗い、前記のようにスポロキストを単離した。単離したスポロキストを 0.1 M トリス - HCl (pH 8.5)、0.2 M NaCl、10 mM EDTA で 2 回洗った。スポロキストを 0.1 M トリス - HCl (pH 8.5)、0.2 M NaCl、50 mM EDTA、1% SDS、150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ プロテイナーゼ K 中で 65°C で 30 分間インキュベートして分解した。室温まで冷やしてから、等量のフェノールで DNA をゆすり 1 時間抽出した。3000 rpm で 10 分間遠心した後水層を除去し、界面とフェノールを 10 mM トリス - HCl (pH 8)、1 mM EDTA で再抽出した。水層を集めてフェノールで 1 回そしてクロロホルム: イソアミルアルコール (24:1) で 2 回抽出した。DNA はエタノール沈澱により単離した。DNA ペレットを 10 mM トリス - HCl (pH 8)、1 mM EDTA に再溶解し、0.15 mg/ml DNase フリー RNase A で 37°C で 1 時間処理した。RNase 消化の後試料をフェノールで 1 回、クロロホルム: イソアミルアルコールで 1 回抽出し、エタノールで沈澱させた。アガロー

スゲルでこの DNA は 20 キロ塩基対よりも大きいと決定した。

バクテリオファージ λ gt wss λ B におけるイー・テネラ (*E. tenella*) ゲノムライブラリーの作成

マニアチスら (Maniatis et al.) らの方法 (32) を用いてバクテリオファージ λ gt wss λ B (25) におけるイー・テネラ (*E. tenella*) のゲノム DNA ライブラリーを作成した。ファージはポリエチレングリコール沈澱、クロロホルム抽出、0.5 M 勾配遠心法により精製した。精製したファージは 1% SDS、50 mM EDTA、150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ プロテイナーゼ K で破砕し、フェノール抽出、クロロホルム抽出そしてエタノール沈澱により精製した。イー・テネラ (*E. tenella*) ゲノム DNA とファージ DNA は EcoRI で完全に分解した。ファージ DNA の左腕及び右腕を粘性末端でアニーリングさせ、腕をシヨ糖密度勾配遠心法により精製した。T4 DNA リガーゼを用いて EcoRI 消化した DNA の 30 μg を EcoRI 消化したイー・テネラ

子の位置や並び方を決めたり、EcoRIゲノムDNA断片の配列を決めたりする方法を考えるためにDNA内における制限部位の位置は重要である。第2図にその制限地図を示す。17,000ダルトンペプチド遺伝子の位置や並び方がこの図に示してある。

クローン108-1のDNA配列の解析

A4抗原の17,000ダルトンペプチド成分の遺伝子を含むクローン108-1のBglII-EcoRI断片の配列を、種々の制限酵素断片を用いるサングー(Sanger)のジデオキシ法(44)により決定した。DNA合成のプライマーとしてオリゴヌクレオチドCOD-92、94、108、そして他の合成オリゴヌクレオチドを用いた。そのDNA配列を第3図に示す。

A4抗原を暗号化する遺伝子の構造

DNA配列はアミノ酸配列から予測されるものと一致する。さらに蛋白の配列からは不明である遺伝子の特徴が3つある。蛋白の知見及び一般的な分泌性蛋白の構造に関する知見を利用して、A4

ダルトンペプチドのGly-65とGly-66のコドンの間の114塩基対部分である。第3は8,000ダルトンペプチドのAsp-186のコドン内の124塩基対部分である。これらの3つの配列は多くの真核細胞生物の遺伝子のコーディング領域に典型的にみられるイントロン構造である。これはmRNAの前駆体中に存在し、「スプライシング」というRNA組み換え機構により除去されて、妨害のはいっていないコーディング配列を有する成熟mRNAを与える。「スプライス接合部」のまわりのDNA配列は他の真核細胞生物の遺伝子にみられる構造と一致する。

17,000ダルトンペプチドの配列は、コドン157と158に対応する配列Gly-Glyで終了するようである。本発明者らは又8,000ダルトンペプチドは、Ala-162で始まりGlu-188まで伸びている配列に対応することを証明した。コドン159から161に対応するペプチド配列Arg-Arg-Leuは見つかっていない。このトリペプチドはインシュリンのような他の蛋白の切断に似

抗原の遺伝子の構造を導き出した。

スボロキスト膜の17,000ダルトンペプチドのアミノ末端(第5図参照)Gln-Asp-Tyr...から、この遺伝子は上流に余分のアミノ酸を23個分暗号化していることがわかる。このDNA配列は多くの分泌性又は膜蛋白の遺伝子のアミノ末端にみられる典型的な「シグナル」配列である(23、3)。これが暗号化しているペプチドは、蛋白が合成の場(細胞質)から及び/又は原形質膜を通して外へ出るのに必要である。このシグナルペプチドは普通その分泌過程で除かれる。A4抗原は種虫の外表面で見出されるためには細胞質膜を通過する可能性が高いため、シグナルペプチドがあつても当然であろう。全ての蛋白の合成はメチオニンから始まるため、シグナル配列のアミノ末端はMetコドンと考えられる。

この遺伝子にはDNA配列が蛋白配列と一致しない部分がある。その最初のもは成熟した17,000ダルトン蛋白配列のVal-7のコドン内にある101塩基対部分である。第2は17,000

ダルトン蛋白配列のVal-7のコドン内にある101塩基対部分である。第2は17,000ダルトン蛋白配列のVal-7のコドン内にある101塩基対部分である。第2は17,000

実施例7

A4蛋白抗原に対する抗イデオタイプ抗体

A4抗イデオタイプ抗体はウサギを精製したA4モノクローナル抗体で感作して調製した。

A4モノクローナル抗体の調製 Ptn 7.2 A4/4ハイブリドーマをBB10^⑧無血清培地(HANA Biologics)で約 2×10^6 細胞/mlの密度になるまで増殖させた。上澄液は抗マウスIgG及び抗マウスIgG_{2b}に対して、アガロースゲル中の二重放射免疫拡散法により試験した。陽性の上澄液は集めて限外超濾法で約50倍濃縮し、50 mM トリス、150 mM NaCl、0.2 % NaN₃、pH 8.4 に対して透析した。次に上澄液をプロテインA-セファロースカラムに通し、免疫グロブリンを結合させた。15倍のベッド容量の上記緩衝液でカラムを洗い、

未結合の蛋白は全て除去した。結合した抗体は、100 mM 酢酸ナトリウム、0.04 M アジ化ナトリウム、pH 4.0、で2 M 画分ずつ、500 mM リン酸緩衝液、pH 7.5、を2 M 含むチューブの中へ溶出させた。次に抗体をDEAE-アフィ-ゲル[®] プルーカラム (Bio-Rad Labs) 中を通過させて、ピーク画分を集め、硫酸アンモニウム沈降により濃縮した。濃縮した抗体を透析して残っている塩を除き、ローリー (Lowry) の蛋白定量法で定量した。8-20 % SDS-PAO ポリアクリルアミドゲル中の電気泳動分離により純度を測定した。

抗イデオタイプ抗体産生

最初是完全フロイントアジュバント中で500 μ g の精製した Ptn 7.2 A 4/4 抗体をウサギに投与し、次に不完全フロイントアジュバント中で500 μ g の抗体を、10日間おきに3回投与した。心臓穿刺によりウサギを出血させ、血清を集めて直ちに-70°Cで保存した。

マウス血清蛋白免疫吸着カラムの調製

非免疫マウスの血清を硫酸アンモニウム(50%

アジュバントを与えた抗体を投与されたものでもよい。14日後さらに100 μ g のアジュバントを抗体で再びワクテン化される。2回目のワクテン化の14日後に、イー・テネラ (*E. tenella*) の接合子株12,000個で鳥に抗原投与する。抗原投与5日後に病変のスコア化を行なった。対照と比較するとA 4抗イデオタイプ抗体でワクテン化した鳥では病変が50-60%減少する。

実施例8

モノクローナル抗体 Ptn 7.2 A 4/4 を用いる鶏の受動的保護

モノクローナル抗体 Ptn 7.2 A 4/4 を用いるイー・テネラ (*E. tenella*) 及びイー・ネカトリックス (*E. necatrix*) 種虫感染に対する防御

イー・テネラ (*E. tenella*) の種虫に対して作成し、インビトロでイー・テネラ (*E. tenella*) の種虫を中和することの証明されたモノクローナル抗体 Ptn 7.2 A 4/4 が、イー・テネラ (*E. tenella*) 又はイー・ネカトリックス (*E. necatrix*) の感染からそれぞれ排泄腔又は経口

飽和)で沈降させ、沈降した蛋白をPBSに再浮遊させ、セファデックス0-25カラムに通し残存する塩を除いた。ピーク画分を集め、100 mM NaHCO₃、500 mM NaCl、pH 8.3に対して透析し、CNBr 活性セファロースと共有結合させた。

A 4 抗イデオタイプ抗体の精製 Ptn 7.2

A 4/4 に対し免疫のウサギの血清を、マウス血清蛋白で調製した免疫吸着カラムにのせた。結合しなかった抗体は2 M 画分で集めて、二重放射免疫拡散法で Ptn 7.2 A 4/4 に対する活性を測定した。次に陽性画分をSDS-PAOにより抗体の重鎖及び軽鎖について調べた。この調製物は鶏をワクテン化するのに使用できる。ワクテン化/防御化試験の代表的なプロトコールは以下のようになる。5% Arlacel 4、94% Drakeol 6-VR 及び1% Tween-80より成る組体3倍量をアジュバントとしたA 4抗イデオタイプ抗体100 μ gを筋肉内投与して鶏をワクテン化する。対照の鳥はワクテン化してないものか、又はA 4抗イデオタイプ抗体と同様の方法で対照ウサギから精製した、

的に鶏を受動的に防御できるか否かを調べるために2つの実験を行なった。実験1では、4週令のSPFホワイトレッグホーンチキン7羽の6群に、イー・テネラ (*E. tenella*) の種虫を10⁶、10⁵又は10⁴個排泄腔に植菌した。種虫はPtn 7.2 A 4/4 モノクローナル抗体の最小中和量(1.75 × 10⁶ 抗体分子/種虫)の8倍量又はSP2/0 ミエローマ上澄液の等量と、あらかじめ1時間インキュベートした。実験2では、4週令のSPFホワイトレッグホーンチキン7羽の6群に、イー・ネカトリックス (*E. necatrix*) の種虫を10⁶、10⁵又は10⁴個、鶏に経口植菌した。植菌の前に、Ptn 7.2 A 4/4 の最小中和量の5倍量で1時間インキュベートした。対称種虫はSP2/0 ミエローマ培養上澄液でインキュベートした。

種虫の排泄腔及び経口植菌にはシリンジと凝固チップを用いた。投与容量を0.5又は1 mlにして適当な数の種虫を与えた。

実験1では10⁶個の種虫を与えた対照群の3羽が4日目と5日目の間にコクジウム症で死んだ。

処理群の中で死んだ鶏はいなかった。同様に病変スコアー及びヘマトクリット値共に、処理群より対照群の方が寛症であつた。

イー・テネラ (<i>E. tenella</i>) 種虫のインビボ中和				
種虫処理	種虫投与量*	ヘマトクリット** $\bar{x} \pm s.d.$	病変スコアー $\bar{x} \pm s.d.$	死んだ数
対 照	10^4	30.1 ± 1.9	2.4 ± 0.7	0
対 照	10^5	23.4 ± 6.8	3.0 ± 0.8	0
対 照	10^6	20.4 ± 5.7	3.9 ± 0.3	3
Ptn 7.2 A 4/4	10^4	33.5 ± 2.1	1.0 ± 0.8	0
Ptn 7.2 A 4/4	10^5	33.4 ± 2.9	1.4 ± 0.9	0
Ptn 7.2 A 4/4	10^6	22.5 ± 4.1	3.4 ± 1.0	1

* 各投与量当たり7羽使用/種虫は排泄腔より投与。

** 生存していた鶏についてのみヘマトクリットを測定した。

実験2における結果は、Ptn 7.2 A 4/4 モノクローナル抗体で処理したイー・ネカトリックス (*E. necatrix*) の種虫を受けた鳥は、感染に対し防御能が付与されていたことを示している。Ptn 7.2 A 4/4 を受けた群の病変スコアーは各対照群より低かつた。

イー・ネカトリックス (*E. necatrix*) 種虫のインビボ中和

種虫の処理	種虫の投与量*	病変スコアー $\bar{x} \pm s.d.$
対 照	10^4	1.6 ± 0.5
対 照	10^5	1.8 ± 0.7
対 照	10^6	3.0 ± 0.9
Ptn 7.2 A 4/4	10^4	0.8 ± 0.4
Ptn 7.2 A 4/4	10^5	1.2 ± 0.4
Ptn 7.2 A 4/4	10^6	2.2 ± 0.7

* 各投与量当たり7羽使用/種虫は経口投与。

実験例9

鶏においてイー・テネラ (*E. tenella*) に対する種虫中和性血清応答と防御応答を誘導するための、イー・テネラ (*E. tenella*) A 4 抗原とその11,500ダルトン断片の使用

A 4 抗原を使用してイー・テネラ (*E. tenella*) に対する種虫中和血清応答を誘導すること

これらの実験で使用したA 4 抗原は、非還元完全A 4 抗原の調製に関する実施例4に記載した方法によりスボロキストから調製した。蛋白の純度と本体は、鶏で使用する前にSDS-PAGE及びモノクローナル抗体Ptn 7.2 A 4/4との免疫反応性により確認した。

ワクチンの調製物は、抗原1部に対して5% Arlacel A, 9.4% Drakeol 6-VR, 1% Tween 80より成る油担体3部の割合で調製し、投与量0.1ml当たり約15 μ gのA 4 抗原が含まれるようにした。必要な場合は抗原を所期のレベルまでPBS (pH 7.2) で希釈した。首の筋肉を通して鶏に0.1ml投与した。抗原は2週間間隔で同じ量を同じ方法でさらに2回投与した。

各回の蛋白投与の3日前及び最終投与の11日後に鶏を出血させて血清試料を集めた。実施例1で記載したように、熱非活性化血清を単独に種虫微量中和法で試験した。

ここに示した結果は組体のみを与えられたワクチン接種を受けてない鶏はイー・テネラ (*E. tenella*) の種虫に対して中和抗血清力価を示さなかつたが、抗原を3回接種された鶏は中和抗血清力価を示した。

A 4 抗原誘導種虫中和定量データ

種虫中和力価 (NDS)

血清試料	最高	最低	中間力価
あらかじめ出血 ^a	N.D. ^b	N.D.	N.D.
非ワクチン化 対照 (n=9)	N.D.	N.D.	N.D.
組体のみ (n=14)	N.D.	N.D.	N.D.
組体/蛋白 ワクチン (n=15)	1:32	N.D.	1:8
免疫血清 ^c (全種虫接種)			1:32

a 各処理群の血清を集めて試験した。

b N.D. = 中和は検出されず

c 数羽の鶏から集めた血清

A 4 抗原を用いて鶏において防御性応答を誘導すること

最後のワクチン化の63日後に、数羽の鶏に胚子形成したイー・テネラ (*E. tenella*) の接合

子嚢を1,000個投与した。翌日さらに3,000個を経口投与した。最終の抗原投与5日後に盲腸の病変をスコア化した。以下にその結果を示す。

イー・テネラ (*E. tenella*) に対する

A 4 抗原でワクチン化した鶏の防御能

	病変スコア \pm s.d.
非ワクチン化対照 (n=17)	3.4 \pm 0.6
アジュバントのみ (n=5)	4.0 \pm 0.0
A 4 抗原/アジュバント ワクチン化 (n=8)	2.4 \pm 1.3

A 4 抗原の11,500ダルトン断片を用いるイー・テネラ (*E. tenella*) に対して種虫中和血清応答を誘導すること

これらの実験に使用した11,500ダルトンの免疫原は、実施例4に記載したようにフェノール抽出によりスポロキストから調製した。蛋白の純度と本体は、鶏で使用する前に SDS - PAGE 及びモノクローナル抗体 Pto 7.2 A 4/4 との免疫反応

性により確認した。

凍結乾燥した精製抗原を0.15Mリン緩衝化生理食塩水に溶解し、5% Arlacel A, 94% Drakeol 6-VR, 1% Tween-80より成る3倍量の組体を、最終抗原濃度が70 μ g/mlになるように懸濁させた。鶏の首の筋肉から投与量0.2 cc 当たり14 μ gの蛋白を与えた。2週間後に同じ方法で同じ経路で投与した。

各回の蛋白投与の1日前及び2回目の投与の2日後鶏を出血させて血清試料を集めた。熱非活性血清を単独に種虫微量中和法で試験した。

下記の結果は、組体のみを与えられたワクチン接種を受けていない鶏はイー・テネラ (*E. tenella*) 種虫に対して中和抗血清力価を示さなかつたが、抗原を投与された鶏は1:81までの中和抗血清力価を示した。

種虫中和定量データ

血清試料*	出血	種虫中和力価 (HDB)		
		最高	最低	中間力価
あらかじめ出血	0 週	<1:3	<1:3	<1:3
非ワクテン化 対 照	2 週	<1:3	<1:3	<1:3
	4 週	<1:3	<1:3	<1:3
抗体のみ	2 週	<1:3	<1:3	<1:3
	4 週	<1:3	<1:3	<1:3
担体/蛋白 ワクテン	2 週	<1:3	<1:3	<1:3
	4 週	1:81	<1:3	1:9
免疫血清 全種虫接種	1:81

* 1 群当たり 5 羽

** 数羽の鶏から集めた血清

A 4 抗原の 11,500 ダルトン断片を用いて鶏に 防御性応答を誘導すること

前記の担体中の約 3 μg の抗原を鶏の首の筋肉

99

tonella) によるコクジウム^(シ)症に対する防御としての本発明の有用性を明瞭に示している。

鶏の中和血清抗体は、A 4 抗原の 17,000 ダルトンポリペプチド成分を認識していることの証明

ウエスタンブロット (4, 46) を用いて A 4 抗原の 17,000 ダルトンのポリペプチド成分に対する血清抗体の特異性を解析した。イー・テネラ (*E. tenella*) の種虫に対する中和力価を有する鶏血清は全て、A 4 抗原の 17,000 ダルトンポリペプチド成分に対する特異性のある免疫グロブリンを有していた。逆に非応答性すなわち対照鶏の血清はどれも、17,000 ダルトンポリペプチド又は他の種虫蛋白に対して特異性を有していなかった。

チキンの中和血清抗体がモノクローナル抗体 Pto 7.2 A 4/4 と拮抗することの証明

イー・テネラスポロゾイトに対し証明可能な中和力価をもつワクテン化鳥由来の血清および相当するコントロール血清は、スポロゾイト膜への結合部位について抗体 Pto 7.2 A 4/4 と拮抗する能

に 1 回投与した。第 2 群には担体物質のみ与えた。最終群は上記 2 群の各々と同じ小屋に入れた (混合)。イー・テネラ (*E. tenella*) で汚染された小屋の中へ鶏を入れてコクジウム^(シ)に接触させた。約 2 週間後鶏を調べるとイー・テネラ (*E. tenella*) に感染していることがわかった。以下の結果が見られた。

イー・テネラ (*E. tenella*) によるコクジウム^(シ) 症に対するワクテン化した鶏の防御

処 理	病変±s.d.	死んだ数
アジュバントのみ (n=5)	3.8 ± 0.4	2
抗原でワクテン化 (n=5)	1.0 ± 0.8	0
混合した鶏 (n=6)	4.0 ± 0.0	6

上記の条件は自然状態で野外でイー・テネラ (*E. tenella*) に接触する場合にそつくりなため、ここに示したデータはイー・テネラ (*E.*

力に関し試験した。ポリスチレン 96 ウエルグラスター (イムロン I) は、約 100 μg 全タン白質/μl レベルで、pH 9.6 の 10 mM グリシン緩衝塩水中スポロゾイト膜タン白質 50 μg で感作させた。連続した 2 倍希釈血清は、Pto 7.2 A 4/4 に結合したアルカリ性ホスファターゼ 1:80 希釈を含有する 0.0005 ヌツイン-20 により、0.15 M リン酸緩衝塩水中調製し、ついで最終容量 75 μl/ウエルで感作プレートに移した。37°C/30 分インキュベーション後、ツイン-20 (0.0005 ヌ) を有する 0.15 M リン酸緩衝塩水を使つて、未反応物質がなくなるまでプレートを洗った。その後、1 μg/μl レベルで 100 mM ジエタノリンベツフアーに溶解したホスホニトロフェノールのナトリウム塩から成る基質を最終容量 100 μl までプレートの各ウエルに加えた。生成した反応生成物は分光光度計によりモニターした。この実験から、中和とイムノブロットにより明かな様に、ワクテンに感応する鳥由来血清にもモノクローナル抗体 Pto 7.2 A 4/4 と拮

抗する抗体を有することが確認できた。この実験により直接明らかになったことは、モノクローナル Ptn 7.2 A 4/4 を使うイムノアフィニティマトグラフィー又は常法のクロマトグラフィーによりスボロゾイト膜から精製した抗原はモノクローナル Ptn 7.2 A 4/4 により規定されたエピトープに対しチキンの免疫応答を刺激することができる。

例 1 0

チキン中のイー・ネカトリックスに対するスボロゾイト中和血清応答を誘導するためのイー・テネラタン白質の使用。

A 4 抗原の 1 1,5 0 0 ダルトン断片(例 9)を接種した鳥由来の熱不活性化血清を集め、胚胎児肺細胞を胚胎児腎細胞と置換して中和試験(例 1)にてテストした。結果は次表に示した。

処 理	中和力価
非免疫チキン血清	< 1:12
A 4 抗原ワクチン	1:48
イー・テネラ全スボロゾイト免疫血清	1:48

原から調製することができる。抗原用のある適当なキャリアーは 5 多アラーセル A、9 4 多ドラケオール 6 - VR、1 多ツイーン - 8 0 である。抗原水溶液 1 部をアラーセル A / ドラケオール 6 - VR 3 部で処方して、最終濃度 1 0 μ g 抗原 / ドースにすることによりワクチンを調製することができる。このワクチンは筋肉内ルートにより任意年令のチキンに投与することができる。適当に接種した鳥は、イー・テネラのフィールド攻撃に帰因する病気、元気のない挙動又は死から防御されよう。

例 1 2

イー・ネカトリックスに帰因する病気からチキンを防御するための抗原のフォーミュレーションおよび使用。

例 1 0 に記述のものをある組成物に含有させることができる。ワクチンは筋肉内ルートにより任意年令のチキンに投与することができる。適当に接種した鳥はイー・ネカトリックスのフィールド攻撃に帰因する病気、元気のない行動又は死から

このデータによれば、鳥が A 4 抗原の精製

1 1,5 0 0 ダルトン断片を受容する場合、イー・ネカトリックスに対する高められた血清中和力価の進展を証明している。A 4 抗原又は A 4 抗原の 1 1,5 0 0 ダルトン断片の投与により、イー・テネラに対する血清中和力価の上昇を来とし、かつ A 4 抗原又は A 4 抗原の 1 1,5 0 0 ダルトン断片の投与により、イー・テネラ攻撃の防御となることが予め証明されていたから、およびイー・ネカトリックススボロゾイト中和力価は A 4 抗原の 1 1,5 0 0 ダルトン断片の投与により上昇するから、イー・ネカトリックスに対する防御は A 4 抗原又は A 4 抗原の 1 1,5 0 0 ダルトン断片の投与の結果であると推論することができる。

例 1 1

イー・テネラに帰因する病気からチキンを保護するための抗原のフォーミュレーションおよび使用。

イー・テネラに原因するコクシウムに対するチキン免疫組成物はモノクローナル抗体 Ptn 7.2 A 4/4 又はその断片により同定される完全な A 4 抗

保護される。

文 献

1. エス・エス・アリ、ピナーツ・ダブリュー・ディーおよびビー・クライムス(1972)、放射したアイメリア・アセルプリナ(silo)による免疫。ジャーナル・オブ・プロテクション 19、177。
2. ダブリュー・ディー・ペントンおよびアール・ダブリュー・デイビス(1977)、その場での単一プラックに対するハイブリッドによる λ gt 超換えクローンのスクリーン化。サイエンス 196、180-182。
3. ジイー・ブローベルおよびビー・ドッペルス・タイン、膜 I に対するタン白質の移動。マウス ミエローマの膜結合リボソームに対するタン白分解的に処理したおよび未処理の新生イムノグロビン L 鎖の存在。ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、67、835-851。
4. ダブリュー・エム・パーネント(1981)「ウエスタンブロッティング」：ドデシル硫

酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲルから未変性ニトロセルロースへのタン白質の電気泳動による移動および抗体と放射性炭素化タン白Aによるラジオグラフ検出。アナリティカル・バイオケミストリー、112、195。

5. エス・エイ・コーエン、ティー・エル・ターピンおよびビー・エイ・ビドリングマイヤー。フェニルイソシアネートによるブ리카ラム誘導法を使うアミノ酸の分析。アメリカン・ラボラトリイ16、48-59。
 6. エイチ・ディー・ダンフォース(1982)。アイメリア・テネラおよびイー・マイテイスに対し向けられたハイブリドーマ産生抗体の発生。ジャーナル・オブ・パラシトロジー68、392。
 7. エイチ・ディー・ダンフォース(1983)。ステージ特異性および寄生虫の浸透と発生に及ぼす試験管内効果を測定するためにアイメリア・テネラスポロゾイテスに対し向けられたモノクローナル抗体の使用。アメリカン・ジャーナル・
- 定用の自動化装置。ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー、1、80。
13. ジエイ・ジエイ・ジウムブロン、ビー・エイ・テ・クレシウスおよびエス・エイ・エドガー(1980)。鳥の胞子虫病。細胞伸介免疫応答の証拠。ポールトリイ・サイエンス、59、38。
 14. フール・エイ・ギボンス、アール・セルウッド、エム・パローおよびビー・エイ・ヘンター(1977)。豚の耐新生B₆ cell下痢の遺伝：遺伝系の試験。セオレティカル・アプライド・ジェネティクス、51、65。
 15. ティー・シー・ゴア、ビー・エル・ロング・エム・コグットおよびジエイ・ジョンソン(1983)。エンブリオ連続継代による米国起源のアイメリア・ネカトリックスおよびイー・テネラの弱毒化。アピアン・ダイジェズ、27、569。
 16. エム・ダブリュ・ハンカビラー、アール・エム・ヘウイング、ダブリュ・ジエイ・ドレイア

オブ・ベテリナリイ・リサーチ、44、1722。

8. エイチ・ダンフォースおよびビー・シー・オーグステン(1983)。鳥の各種コクシウムに対する免疫血清およびハイブリドーマ抗体の特異性と交差反応。ポールトリイ・サイエンス、62、2145。
 9. ビー・ジエイ・デイビス、エス・エイ・パリーおよびビー・ポータ(1978)。チキンの抗コクシウム免疫性における分泌型IgAの役割。イムノロジー、34、879。
 10. ビー・ジエイ・デイビスおよびビー・ポータ(1979)。アイメリア・テネラの細胞浸透および細胞内発生の分泌型IgA伸介阻止のメカニズム。イムノロジー、36、471。
 11. ジエイ・エイ・ドボラックおよびエム・セント・ジエイ・クレーン(1981)。プロトゾア寄生虫による脊椎細胞サイクルモジュレート感染。サイエンス、214、1034。
 12. ビー・エドマンおよびジイー・ベツグ(1967)。タン白シークエネータ。配列決
- 一およびエル・イー・フード(1983)。気相シークエネータによる高感度配列化。メソツプ・イン・エンザイモロジー、91、アカデミク・プレス、ニューヨーク、399-413。
17. エム・ダブリュ・ハンカビラー、ジエイ・イー・ストリックラーおよびケイ・ジエイ・ウィルソン(1984)。タン白質構造決定の現代方法論。サイエンス、226、304-311。
 18. ティー・ケイ・ジェフアーズ(1975)。早熟の選択によるアイメリア・テネラの弱毒化。ジャーナル・オブ・パラサイトロジー、61、1083。
 19. ティー・ケイ・ジェフアーズ(1976)。アイメリア・テネラに対する早熟性および抗コクシウム薬剤耐性の遺伝的組換え。フアイトシユリフト、ヒュール・パラサイテンクンデ、50、251。
 20. ジエイ・ジョンソンおよびダブリュ・エム・レイド(1970)。抗コクシウム薬剤。チキンによるバタリーおよびフロアー・ペン実験に

- における病変スコア技術。エクスペリメンタル・パラサイトロジイ、38、36。
21. エル・エイチ・キャスパー、ジエイ・エイチ・クラブおよびイー・アール・フエファーコン(1983)。モノクローナル抗体の免疫吸収によるトキソプラズマ・ゴンジの主膜タン白質の精製。ジャーナル・オブ・イムノロジー、130、2407。
22. ジイー・ティー・エイシュ(1979)。特異的膜レセプター：感染病における病原的および治癒的關係。レビュー・インフエクシャス・ディーズ、1、517。
23. ジイー・クリーン(1981)。膜に対するタン白質のトランスポート。アニュラー・レビュー・バイオケミストリー、50、317-348。
24. ユー・ケイ・レムリイ(1970)。バクテリオファージ T4 のヘッドの組立てを通じて構造タン白質の切断。ネイチャー、227、680。
- 1。
30. ロング・ビー・エルおよびローズ・エム・イー(1965)。アイメリア・テネラの誘導感染に対するヒヨコの能動および受動免疫。エクスペリメンタル・パラシット16、1。
31. ロウダー・エル・ジエイ(1966)。家畜におけるアイメリア・ボビス感染に対する人工的獲得免疫。プロシーディングス・オブ・インタナショナルコンGRESS・パラシット1、106。
32. マニアティス・ティー、フリッツ・イー・エフおよびサムブルック・ジエイ(1982)、モレキュラー・クローニング・ラボラトリイマニユアル、コールドスプリングス、ハーバーラボラトリイ、ニューヨーク。
33. マークアット・ダブリュー・シー(1980)、コクシジウムにおける宿主およびサイト特異性、予想。ジャーナル・オブ・プロトゾオロジイ、26、243。
34. マキサム・エイおよびギルバート・ダブリュー(1980)、塩基特異性化学変化をもつ末端ラベルした DNA のシーケンス化、メソフ・イン・エンザイモロジイ、65巻、パート1、アカデミック・プレス・ニューヨーク、499-559。
25. リーダー・ビー、タイマイアー・ディーおよびエンキスト・エル(1977)。高級生物体由来のクローニングに有用なバクテリオファージラムダの BK 2 誘導体： λ gt WES システム。サイエンス196、175-177。
26. ロング・ビー・エル(1972)アイメリア・ミパチ：継代培養により鶏ヒヨコ胚の再生、病原性および免疫性。ジャーナル・オブ・コンパソロジイ82、839。
27. ロング・ビー・エル(1974)。アイメリア・テネラのエンブリオ適用株の病原性および免疫性に及ぼす研究。アビアン・パソロジイ3、255。
28. ロング・ビー・エル(1982)。ザ・パイオロジイ・オブ・ザ・コクシジアパーク大学出版、パルチモア、44。
29. ロング・ビー・エル、ジョンソン・ジエイおよびゴア・ティー・シー(1982)。エンブリオ継代培養による米国起源のアイメリア・ミパチ株の弱毒化。アビアン・ディーズ26、
35. マクドナルド・パイおよびバリンゴール・エス(1983)。早熟発生の選択によるアイメリア・ミパチ(：マイティス)の弱毒化。パラシットロジイ、86、371。
36. マクドナルド・パイおよびバリンゴール・エス(1982)。早熟性アイメリア・アセルブリナの病原性、免疫性および安定性の研究。パラシットロジイ86、361。
37. マクドナルド・パイ、バリンゴール・エスおよびシャーリー・エム・ダブリュー(1982)。アイメリア・アセルブリナの弱毒株に供したヒヨコにおける感染と免疫の性質に関する予備研究。パラシットロジイ84、21。
38. マクドナルド・エル・アール、コクシジウムのステイタス：開発中の新製、ボウルトリイ・ダイジェスト、1981年10月。

39. マクドガルド・エル・アール、新規抗コクシジウム剤：やつて来る良事又は“危険のある種？”フィードスタックス、1983年8月15日。
40. ミラー・エル・エイチ、メイスン・エス・ジエイ、ドボラック・ジエイ・エイ、マクギニス・エム、エイチおよびロスマン・アイ・ケイ（1975）、（プラスモディウム・ノウレン）マラリアの赤血球リセプター：ダツファイ血液型決定子、サイアンス 189、561。
41. レイド・ダブリュー・エム（1978）、プロトゾア、家畜の病気、7版、エム・エス・ホフスタッド編、アイオワ州立大学、942-1054。
42. ライリー・ジエイ・エフ（1980）、抗コクシジウム活性のスクリーニングおよび評価。アドバンスト・フアーマシユティカル・ケモ、17、1。
43. ローズ・エム、イー（1974）、アイメリアに対する免疫応答：最近の観察、球虫類および

アイメリア・ネカトリツクス：卵に適用（弱毒化）したラインの発現と特性、パラシトロジイ 81、525。

49. シャーリー・エム・ダブリュー（1982）、アイメリア・レユツクスの弱毒化ラインの特性。パラシトロジイ 英国寄生虫学会報告 81、525。
50. シャーリー・エム・ダブリュー、ベラツチ・エム・エイおよびミラード・ピー・ジエイ（1982）、アイメリア・ネカトリツクスの卵形（弱毒化）ライン：その再生病原性および免疫性に対する研究、パラシトロジイ 84、215。
51. スピーア：ディー・エイ、ウォン・アール・ビーおよびシエンケル・アール・エイチ（1983）、アイメリア・テネラ（球虫類）スポロゾイトに及ぼすモノクローナル IgG 抗体の影響、ジャーナル・オブ・パラシトロジイ、69、775。
52. スピーア・シー・エイ、ウォン・アール・ビーおよびシエンケル・アール・エイチ（1983）、

び関連生物のシンボジウム、92-118、ゲルフ大学、オンタリオ。

44. サンガー・エフおよびカルスン・エイ・アール（1978）、DNA シークエンスに対する薄いポリアクリルアミドゲルの使用。フエブス・レター、87、107-110。
45. シュミット・ジイー・オーおよびロパーツ・エル・エス（1977）、寄生虫学の基礎、モスビー社、セントルイス、122-128。
46. シャーマ・エス・ディー、ムレナツクス・ジエイ・アロージョ・エフ・ジイー、エーリツヒ・エイチ・エイおよびレミントン・ジエイ・エス（1983）、ヒト IgM および IgG 抗体により認識されたトキソプラズマ・ゴンダイの抗原のウエスタンブロット分析、ジャーナル・オブ・イミュノロジイ 131、977。
47. シャープ・ピー・エイ（1981）、RNA スプライシングに関する考察セル 23、643-646。
48. シャーリー・エム・ダブリュー（1980）、

アイメリア・テネラ接合子のう、スポロシストおよびスポロゾイトの抗原部位に対するモノクローナル IgG 抗体のウルトラ構造局在、ジャーナル・オブ・プロトゾール、30、548。

53. スタイナー・ディー・エフ、クイン・ビー・エス、チャン・エス・ジエイ、マーシュ・ジエイおよびタイガー・エイチ・エス（1980）、タン白質の生合成におけるプロセッシング機構、アニマル、ニューヨーク・アカデミイ・サイアンス、343、1-16。
54. スペナーホーム・エイ、ランジ・エスおよびホームグリン・ジエイ（1978）特異的イムノグロブリン A の腸間合成およびマウスの実験コレラに対する保護間の関係。1 ref. 1 ref、21、1。
55. ファン・ドイセン・アール・エイおよびウエストストーン・シー・エイ（1981）診断試薬として抗ウイルスモノクローナル抗体を産生する実用面。プロシーディングス・アメリカン・アソシエーション、ペテリナリイ・ラボラトリ

イ・ダイアグノスト、24、211。

56. ビエラ・ジェイおよびメツシング・ジェイ
(1982)、P00 プラスミド、挿入突然変異
発生の M13 mp7 - 由来系および合成ユニベ
ーサルプライマーによるシーケンス、ジーン
19、259-268。

57. ウィツシャー・エム・エイチ(1983)、
ジャーナル・オブ・セルラー・バイオケミスト
リイ、Supp. 7A。アブストラクト0059。

58. ウォン・アール・ビーおよびシエンケル・ア
ール・エイチ(1984)、Fed. Proc. 184,
43(6)、1630。

59. ライト・アイ・ジー、ホワイト・エム、トレ
イシー・パツタ・ビー・デー、ドナルドソン・
アール・エイ、グツジャー・ビー・グイ、ウル
タイスパール・オー・ジェイおよびマホニー・
デー・エフ(1983)、パネシア・ボピス:
モノクローナル抗体を使つて保護抗原の単離、
インフエクシエン・アンド・イミューニティ41、
244。

60. リグレイ・シー・ダブリュー(1971)、
ゲルエレクトロフォーカス:メソツズ・イン・
エンザイモロジー、第XXII巻、ジャコビー・ダ
ブリュー・ビン編、アカデミックプレス、559
-564。

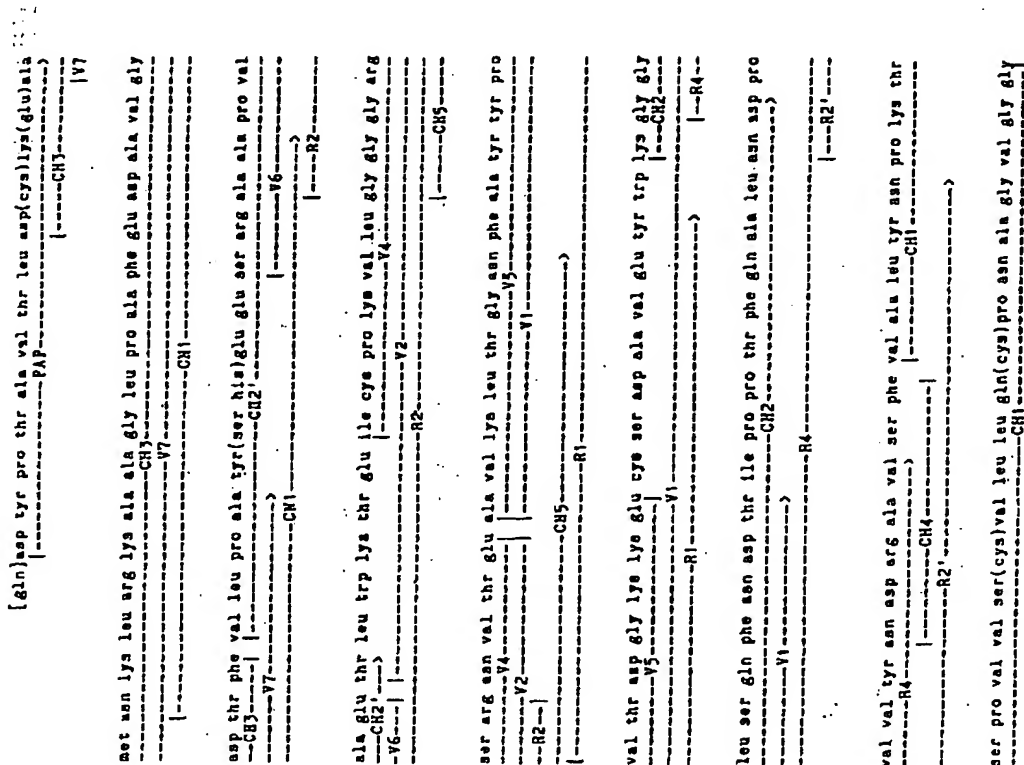
4. 図面の簡単な説明

第1図はA4抗原の17,000ダルトンポリペ
プチド成分のアミノ酸配列を示す。

第2図はA4抗原をコードするイー・テネラの
ゲノムクロンの制限酵素地図を示す。

第3図a~cは、第2図に示したゲノムクロ
ンのBgl II - BcoRI DNA断片の配列を、A4抗原
の17,000ダルトンおよび8,000ダルトンポ
リペプチド成分、およびシグナルペプチドのアミ
ノ酸配列をおよび遺伝子内のイントロンを示す。

代理人 浅 村 皓

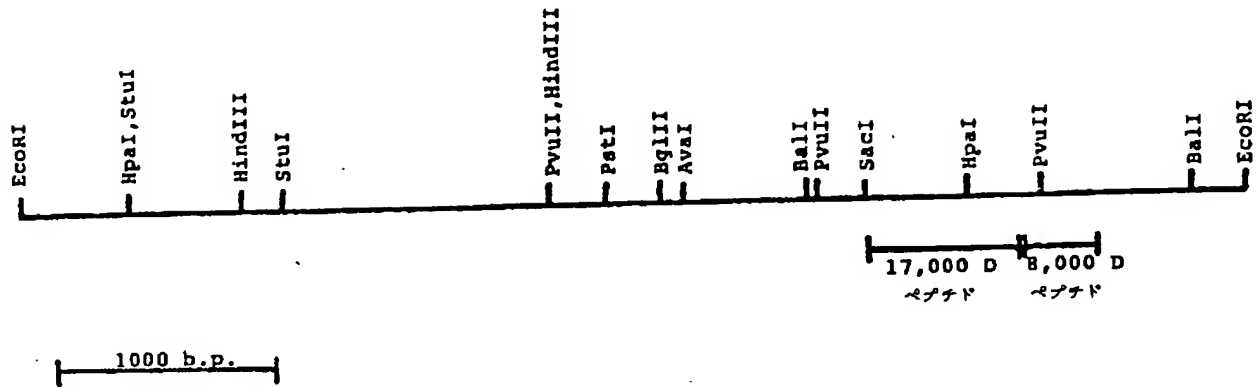


> 図はシグナルペプチド配列を示すが、本発明は、
 1 ペプチドC-末端を示す。
 (1) DNA配列により推定された可能な71/9。
 、第2配列を示す。
 CH: 酸化シアン基、CH: キモトリプシン断片、N: Arg-CHN、V: Val、
 PAP: ビロゲルタクト72ノペプチド-セグメントの17,000ダルトンポリペプチド。

第3a図

AGATCTATCAAGCAATAATCATCTA
 CCTCCAAATATATGCTATGAAATGCTAAAT8CGTGAGAGTCTTCTCAGCAACGTC
 TCATGCAAGTGTCCCGAAGCTGA5GGGAGAAACAGTGCAGTACCGCGGTGCTGCTA
 TTTCTTGTCTTCAATGCAAAAGCGGCAATTTCAAGTGCCATTTTCTTCTTATATCACA
 TAGTTTCCCAATAAATGAGGGGAATATTTCTGTTAAGCTGTTCTTCTGCGAGTTTCAAG
 AAGTCACACCGTCACTCGGAGGTAACTGGAAGGCGGCGGTGCGCAAGAAATGCGGCAAG
 GCATGCAACAAATGAAGCTGAGAGCGGCTCAAA3GGAATGAAATTTCAATTTACGTTT
 CGCTTAAATCCATTCAGTGGGCGGAGACCGCTCTCGGAAGTGCAGTCTGTTTGGAT
 GCATTTCCCTGCACACCTATGACGAGTACGCTGTTGCGCAAGAACTGGAACATAGCGTT
 TAGGTCTAAGCCCGCAGCCAAAGAACTCTGCATATCTTTTCCCAAGATATTTCAATAA
 AAGCTCTTTGCGGAATGTATTTTCAACCTCTATCTATCTATTTCTGCGGACATGAGAG
 GCAGCAAGCTGTAGCTGCTTCCATGCGCAGCAGCGGCGGCAAGTTAGCGCAGCAGC
 TGTCAACCTGCTGTATCTGTCAACAGCGCGCAGAACTTTCCCATATCTGTCAAAAC
 ATATTTATCTGCTCAGTTTACAGTTTCTGTACAGTCTTTTGCATATTTATACAATTACT
 MetAlaArgLeuSerPheValSerLeuLeuSerLeuSer
 GTACAGTCATATTTGCTCAAAATGGCTCGTCTTTCTTTTCTTCTCTTCTTCTCTGCA
 LeuLeuPheGlyGlnGlnAlaValArgAlaGlnAspTyrProThrAlaV<-----
 CTGCTCTTCGGGCAAGCAGTCAGAGCTCAGAGTATGCCAACAGCAGGTGGGCTTTTC
 -----Intron A-----
 CGCTAGCTGTTTTGCTCGATAGCATGGAGCATCTCCCAAAACGAGTGCATTCACC
 ----->alThrLeuAspCysLysGluAlaMetAsn
 TTTTGCATGTTGTGCGGAAATTTATCAGTTACGCTGGACTGTAAAGACCGATGAAAC
 LysLeuArgLysAlaAlaGlyLeuProAlaPheGluAspAlaValGlyAspThrPheVal
 AAGCTGAGAAAGCAGCAGGAGCTTCCTGCTATCGAGATGCTGTGGGAGACACATTTGT
 LeuProHisTyrSerHisGluGluSerArgAlaAlaProValAlaGluThrLeuTrpLys
 CTACCAGCATACTGCGATGAAGAGTCTAGGCGGCGCACCCAGTAGCTGAACACTCTCTGGAAG
 ThrGluIleCysProLysValLeuGly<-----
 ACGAAGATATGCCCAAAAGCTTAGAGGTAAAGCGTCCACGGCTTCATCGTCATCATG

第2図



第3b図

```

-----Intron B-----
TAATAAGTGTCTGACAGCTTCTGTTCTGGAACAAGGAACCTACACTGCTCTGAATTT
ATCATCCACAAGACTCGTCAAGCAAGACACCTTCTCTTGATGTACAGGAACCTTAA
----->GlyArgSerArgAsnValThrGluAlaValLeu
TTAATCTTTTGTACATACAGGCGCGAAGCTCCAGGAACGTTTCTGAGCTGTCAAGCTTA
ThrGlyAsnPheAlaIleTyrProValThrAspGlyLeuGluCysSerAspAlaVal
ACTGGCAATTTTGGCTACTACCCCTCCAGACGGCAAAAAGAAATGACAGCATGTGTGT
GluTyrTrpGlyGlyLeuSerGlnPheAsnAspThrIleProProThrPheGlnAla
GAGTACTGGAAGGCGGACTTCTCAATCAACGACACAAATCCCGCAACGTTCCAAAGCG
LeuAsnAspProValValTyrAsnAspArgAlaValSerPheValAlaLeuTyrAsnPro
TTGAAGCAGCGGTTGTGTACAAATGACAGGCTGTCTTCTTGTCCGCTTATACAGCCCG
**
LysThrSerProValValSerCysValLeuLeuGlnCysProAsnAlaGlyValGly
AAAACGAGCCCGTTGTGAGTTGGTGTCTCCAGTCCCTAAATGCAAGTGTGTGTGGA
+
ArgArgLeuAlaAlaGlyThrThrAspAlaValIleCysLeuThrAsnProAlaProLeu
CGCAGGCTTCGCGCAGGACACGACAGAGCTGTCTCAATTCCTTGCATCAAAATCGCGCTCTTGT
GluAlaArgSerGlnProPheAsn<-----
GAAGCAAGGTCACAACCATTTCCAGATGAGAGTCAGCTGGTCCGCCACATGCAACATGATCAA
-----Intron C-----
TGGCGCAAGTTACACTGGGGTCTGTAAAGTTGGTTGAAAGCCAACTTCTTAATACTTGT
----->AspGluGlnTrpLysLysIleValAspSerLe
TGTAAATTTTGTAAATGTTTGGTGTCAAGCAAGCAATGGAAGAAATTTGTGACTCTCT
uSerLeuSerGluGluGluGluGlyValValSerProValValProSerValAl
ATCTCTCTGTAGAAAGAGAAAGAGAGGGCGAGTTCTCCAGTGTGTCTTCAATGAG
**
aLeuIleSerAlaAlaValIleSerAlaPheAlaLeuPhe
CCTCATCTCTCGCGGGTGTATCTCGGCTTCTGCTCTCTTTTAGCGGCGCGCGGTTTGA
GTGACACACAGCATTTGACAGATATGCGGGCGCAAGTTCTTCTTCAATGAAATCTTGT
AGTACAAACGAGCAGCTCTCTCTGAGCAAAATGTATGATGAAATTAAGACAGCTTTGGTGT
TGAAGTGTATGCAAAAGCTACATTTGTAGGGCCCTTTTATAGGATTAATCGGAGGAAGCGC
AATTTTATTTAAACCTTTGACAGAGATGCGCCACGTCGAGTGTCAAGTGTTCGCGCAGTGT
GTGCTGCCAAATGAAATTCCTCATCTTTTGTGTACTCAAGCCAGAAAGTTTCGCGGTTCAT
GTACCGCGCGGTGGTATCTGCCATGCCATGCCCTGCTTTTGGGCAGTACAACTCATAC

```

第3c図

```

CAAGTGGGCTTGTGTCATGGCATGTGTGGCCAAAGCTACTTTTACAGGGACAACAATGGGGA
TATTTTGAAATATTTTCGGATAAAATACTCATCTGCTGTCCCTACCCACTGAGGGCGGCATGG
TGTTACCTTTCCTCATTTTAAAGGGGAAAACTTGGTTGATAATTTCTTCTTCAACTTGT
CTTGATAAAATCGAAAGATTATATTGTAGATAAGTATACGTGGTGAACAGTTTTTACGGAAGA
CTGTAAACCACAAAGTTAAACGTAGTCGGAATTC

```

- 17,000 ドルトンペプチドの初期アミノ酸
- ◆ 17,000 ドルトンペプチドの最終アミノ酸
- + 8,000 ドルトンペプチドの初期アミノ酸
- ++ 8,000 ドルトンペプチドの最終アミノ酸

手続補正書(方式)

昭和60年10月1日

特許庁長官殿



1. 事件の表示

昭和60年特許庁第100355号

2. 発明の名称

コクシジウムモノクローナル抗体

3. 補正をする者

申請との関係 特許出願人

住所

氏名

(代表)

リルバイ アド カンパニー
(V3エテ アニム)

4. 代理人

住所

〒100 東京都千代田区大塚町二丁目2番1号

新大塚町ビルディング331

電話 (211) 3651 (代表)

氏名

(6669) 浅村



5. 補正命令の日付

昭和60年8月27日

6. 補正により増加する発明の数

7. 補正の対象

明細書

図面

法人格発明及びその派生各1項



8. 補正の内容 別紙のとおり

明細書の修正 (内容に変更なし)

図面の修正 (内容に変更なし)

第1頁の続き

⑥Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号
C 07 K 13/00		6464-4H
		6464-4H
C 12 N 15/00		7115-4B
C 12 P 21/00		7235-4B
G 01 N 33/569		7906-2G
		7906-2G
		33/577

優先権主張 ②1985年5月16日③米国(US)④734085

②発明者	ジョン エル・テデス	アメリカ合衆国アイオワ州チャールズ シイテイ, ダンベ コ リイ ドライブ 311
②発明者	ゲイリイ アール・ビ ーターセン	アメリカ合衆国アイオワ州チャールズ シイテイ, セカン ド アベニュー 210
②発明者	ランディ アール・シ モンソン	アメリカ合衆国アイオワ州チャールズ シイテイ, アール アール 1
②発明者	バージニア メリイ ブラザーズ	アメリカ合衆国カリフォルニア州アルバニイ, ベラルタ アベニュー 988
②発明者	ジェームス ゴードン ファイルズ	アメリカ合衆国カリフォルニア州ベルモント, リヨン ア ベニュー 1911
③発明者	レランド ショーン ポール	アメリカ合衆国カリフォルニア州ウッドサイド, スカイラ イン 14826

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第3部門第2区分
 【発行日】平成5年(1993)7月20日

【公開番号】特開昭61-69798
 【公開日】昭和61年(1986)4月10日
 【年通号数】公開特許公報61-698
 【出願番号】特願昭60-122355
 【国際特許分類第5版】

C07K	15/08	7731-4H
A61K	39/012	8413-4C
	39/395	8413-4C
C07K	13/00	7731-4H
	15/04	7731-4H
C12N	15/00	8828-4B
C12P	21/00	8214-4B
G01N	33/569	9015-2J
	33/577	9015-2J

手 続 補 正 書

平成4年6月2日

特 許 庁 長 官 殿

1. 事件の表示

昭和60年特許願第122355号

2. 発明の名称

コクシジウムのモノクローナル抗体

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名 称 ソルベイ アンド カンパニー
 (ソシエテ アノニム)

4. 代 理 人

居 所 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
 新 大 手 町 ビ ル デ ィ ング 831
 電 話 (3211) 3 6 5 1 (代 表)
 氏 名 (6669) 浅 村 皓

5. 補正により減少する発明の数 22

6. 補正の対象

明細書の特許請求の範囲の欄

7. 補正の内容 別紙のとおり

8. 添付書類の目録 同時に審査請求書を提出してあります。

2. 特許請求の範囲

(1) 鶏においてエイメリア・テネラ(Eimeria tenella)又はエイメリア・ネカトリックス(Eimeria necatrix)による感染に対する防御能をあたえる免疫応答を誘導することのできる精製した抗原性蛋白において、分子量が約17,000であり、N-末端アミノ酸がブロックされている第(3)図に示すアミノ酸配列を有する1つのポリペプチドと、分子量が約8,000であり第(3)図に示すアミノ酸配列を有するもう1つのポリペプチドが、ジスルフィド結合により結合した、2つのポリペプチドより成る、分子量が約25,000の上記蛋白。

(2) 特許請求の範囲第1項に記載の蛋白のアミノ酸配列に含まれるアミノ酸配列を有し、鶏においてエイメリア・テネラ(Eimeria tenella)又はエイメリア・ネカトリックス(Eimeria necatrix)による感染に対する防御能をあたえる免疫応答を誘導することのできる抗原性ポリペプチドたる精製した抗原性蛋白。

(3) 特許請求の範囲第1項に記載のポリペプチド

のアミノ酸配列に含まれるアミノ酸配列を有し、分子量が約11,500である抗原性ポリペプチドたる精製した抗原性蛋白。

(4) 特許請求の範囲第1項に記載のポリペプチドのアミノ酸配列に含まれるアミノ酸配列を有し、分子量が約6,500である抗原性ポリペプチドたる精製した抗原性蛋白。

(5) 鶏においてエイメリア・テネラ(*Eimeria tenella*)又はエイメリア・ネカトリックス(*Eimeria necatrix*)による感染に対する防御能をあたえる免疫応答を誘導することのできる、特許請求の範囲第2項に記載の抗原性ポリペプチドより成る抗原。

(6) 第3図に示すアミノ酸配列に含まれないアミノ酸配列をもさらに有する特許請求の範囲第5項に記載の抗原。

(7) 特許請求の範囲第1項に記載の蛋白又は17,000ダルトンのポリペプチドの調製方法において、

a. スポロキスト膜蛋白を可溶化するためにプロテアーゼ阻害剤の存在下で適当な非還元条件下

で、エイメリア・テネラ(*Eimeria tenella*)のスポロキストを界面活性剤と接触させ、

b. 可溶化したスポロキスト膜蛋白を適当な非還元条件下で別々に回収し、又はさらに、

c. 該スポロキスト膜蛋白から適当な還元条件下でポリペプチドを別々に回収する、
ことより成る上記方法。

(8) スポロキスト膜蛋白を別々に回収することとは、可溶化されたスポロキスト膜蛋白をイオン交換及びハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーにより部分的に精製することである特許請求の範囲第7項に記載の方法。

(9) スポロキスト膜蛋白を別々に回収することとは、モノクローナル抗体Ptn 7.2 A4/4を用いる免疫沈降法又は免疫親和性クロマトグラフィーより成る特許請求の範囲第7項に記載の方法。

(10) ポリペプチドを別々に回収することとは、DEAEセルロースによるクロマトグラフィーの後適当な還元条件下で調製SDS電気泳動により、可溶化したスポロキスト膜蛋白を部分的に精製する

ことより成る特許請求の範囲第7項に記載の方法。

(11) 特許請求の範囲第3項に記載のポリペプチドの調製方法において、

a. スポロキストより種虫膜蛋白を抽出するために、8-ヒドロキシキノリンの存在下でエイメリア・テネラ(*Eimeria tenella*)のスポロキストをフェノールに接触させ、

b. モノクローナル抗体Ptn 7.2 A4/4を用いて免疫沈降法又は免疫親和性クロマトグラフィーにより抽出したスポロキスト膜蛋白からポリペプチドを回収する、

ことより成る上記方法。

(12) 特許請求の範囲第4項に記載のポリペプチドの調製方法において、

a. 蛋白を可溶化するためにトリプシン-タウロレートで脱糞させた種虫膜蛋白を界面活性剤に接触させ、

b. モノクローナル抗体Ptn 7.2 A4/4を用いて免疫沈降法又は免疫親和性クロマトグラフィーにより可溶化した脱糞させた種虫膜蛋白よりポリペ

チドを回収する、

ことより成る上記方法。

(13) 特許請求の範囲第1項又は第2項のいずれかに記載の蛋白又はポリペプチドの調製方法において、該蛋白又はポリペプチドを暗号化するDNA分子を開裂し、DNA分子を適当な発現ベクターに挿入し、こうして得られる発現ベクターを適当な条件下で適当な宿主に導入してDNAを発現させ及び蛋白又はポリペプチドを産生させ、こうして得られた蛋白又はポリペプチドを回収することより成る上記方法。

(14) 特許請求の範囲第1項に記載の蛋白又は特許請求の範囲第2項もしくは第5項に記載のポリペプチドの有効な免疫量を鶏に投与することより成る、エイメリア・テネラ(*Eimeria tenella*)又はエイメリア・ネカトリックス(*Eimeria necatrix*)による感染に対し鶏に能動免疫を与える方法。

(15) 有効な免疫量とは約0.1 μ gから約1.0mgである、エイメリア・テネラによる感染に対し鶏に能動免疫を与える特許請求の範囲第14項に記載の方

法。

(16) 有効な免疫量とは約0.1 μ gから約1.0mgである、エイメリア・ネカトリックスによる感染に対し鶏に能動免疫を与える特許請求の範囲第14項に記載の方法。

(17) エイメリア・テネラ(Eimeria tenella)又はエイメリア・ネカトリックス(Eimeria necatrix)による感染に対し鶏に能動免疫を与えるためのワクチンにおいて、1回の投与量当たり有効な免疫量の特許請求の範囲第1項に記載の蛋白又は特許請求の範囲第2項もしくは第5項に記載のポリペプチドと適当な担体を含有する上記ワクチン。

(18) 有効な免疫量とは鶏の体重1kg当たり約0.1 μ gを超える量である特許請求の範囲第17項に記載のワクチン。

(19) 特許請求の範囲第17項に記載のワクチンの適当な量を鶏に投与することより成る、エイメリア・テネラ(Eimeria tenella)又はエイメリア・ネカトリックス(Eimeria necatrix)による感染から鶏を防御する方法。

(24) 特許請求の範囲第21項に記載のモノクローナル抗体に対する抗イディオタイプ抗体。

(25) 特許請求の範囲第24項に記載の抗イディオタイプ抗体の有効な免疫量、又は該抗イディオタイプ抗体及び適当な担体の有効量を含有するワクチンの適当量を鶏に投与することより成る、エイメリア・テネラ(Eimeria tenella)又はエイメリア・ネカトリックス(Eimeria necatrix)による感染に対し鶏に能動免疫を与える方法。

(26) 特許請求の範囲第24項に記載の抗イディオタイプ抗体及び適当な担体の有効な免疫量を含有する、エイメリア・テネラ(Eimeria tenella)又はエイメリア・ネカトリックス(Eimeria necatrix)による感染に対し鶏に能動免疫を与えるためのワクチン。

(27) 特許請求の範囲第1項に記載の蛋白を暗号化する核酸分子。

(28) 第3図に示す核酸配列を有する特許請求の範囲第27項に記載のDNA分子たる核酸分子。

(29) 特許請求の範囲第27項に記載のcDNA分子た

(20) 特許請求の範囲第1項又は第2項に記載の蛋白又はポリペプチドに対するモノクローナル抗体。

(21) ハイブリドーマ細胞株ATCC No. HB8561により産生されるモノクローナル抗体Ptn 7.2 A4/4である特許請求の範囲第20項に記載のモノクローナル抗体。

(22) 特許請求の範囲第20項又は第21項に記載の抗体の有効な防御量、又は該抗体の有効な防御量と適当な担体とよりなる組成物の適当量を鶏に投与することより成る、エイメリア・テネラ(Eimeria tenella)又はエイメリア・ネカトリックス(Eimeria necatrix)による感染に対し鶏に受動免疫を与える方法。

(23) エイメリア・テネラ(Eimeria tenella)又はエイメリア・ネカトリックス(Eimeria necatrix)による感染に対し鶏に受動免疫を与えるための組成物において、有効な防御量の特許請求の範囲第20項又は21項に記載の抗体及び適当な担体より成る上記組成物。

る核酸分子。

(30) 特許請求の範囲第2、第3、第4、第5、又は第6項のいずれか1項に記載のポリペプチドを暗号化するDNA分子。

(31) 特許請求の範囲第27項に記載の核酸分子より成るクローニング媒体(vehicle)。

(32) 特許請求の範囲第31項に記載のクローニング媒体(vehicle)より成る宿主細胞。

(33) 特許請求の範囲第32項に記載の細菌たる宿主細胞。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)